# ECOLOGIA, PATOGENICITA' E VIRULENZA DEI FUNGHI

# Nicchia ecologica

- Ambiente nel quale il microrganismo produce il suo tallo assimilativo e genera la sua progenie.
- Ogni specie fungina è quindi isolata con maggior frequenza dalla sua nicchia naturale piuttosto che da altre sorgenti.

**Tabella 64.5** **Possibile ecologia di alcuni funghi patogeni.**

| Nome | Nicchia ecologica | Reservoir animale |
|---|---|---|
| *Blastomyces dermatitidis* | Legno? | Cane |
| *Coccidioides immitis* | Suolo desertico | Roditori |
| *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* | Legno | Piccione |
| *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* | Legno | Koala |
| *Histoplasma capsulatum* | Sterco di pipistrello, guano | ? |

[Modificata da: G.S. de Hoog, J. Guardo, J. Gené, M.J. Figueras, *Atlas of Clinical Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.]

- EURIECHE: sono dette le specie che hanno acquisito la capacità di tollerare condizioni di crescita al di fuori della propria nicchia ecologica. Tale caratteristica le ha rese in grado di colonizzare un'ampia varietà di ambienti. Ciò è possibile grazie a meccanismi che permettono la conversione in uno stato metabolicamente inattivo come **Clamidospore o Endoconidi**.
- Questi sono funghi facilmente coltivabili.

- STENOECHI: funghi altamente specializzati, che richiedono condizioni particolari per il loro isolamento.
- Alcuni sono noti come patogeni, per es. *Pneumocystis jerovecii*, *Basidiobolus o Conidiobolus*.

# Miceti patogeni facoltativi:

- Usano il corpo di mammiferi solo durante una parte del loro ciclo vitale, ma rimangono in grado di crescere e riprodursi nell'ambiente.
- Hanno due nicchie ecologiche, così che il loro ciclo vitale può essere suddiviso in due parti differenti radicalmente.

# Miceti patogeni obbligati

- Alcuni funghi si riscontrano esclusivamente nei mammiferi, svolgendo su di loro soltanto il loro ciclo vitale.

- Spesso i miceti sono acquisiti dall’ambiente o fanno parte di una flora commensale. Si stabilisce malattia solo in condizioni di soppressione dell’immunità o con interruzione del tegumento protettivo dell’ospite.
- Le malattie acquisite dall’ambiente hanno la capacità, attraverso la selezione di loro caratteristiche, di stabilirsi in ospiti mammiferi in condizioni immunitarie integre.

# Yeast systemic mycosis

| Fungus | Clinical manifestations | Symbiosis | Dymorphism | Morphotypes |
|---|---|---|---|---|
| *Blastomyces dermatitidis* | Cutaneous to disseminated diseases | N o | Yes | Yeast, mycelium |
| *Coccidioides imimitis* | Pulmonary to disseminated diseases | N o | Yes | Yeast, mycelium |
| *Histoplasma capsulatum* | Pulmonary to disseminated diseases | N o | Yes | Yeast, mycelium |
| *Paracoccidioides brasiliensis* | Pulmonary to disseminated diseases | N o | Yes | Yeast, mycelium |
| *Cryptococcus neoformans* | Pulmonary to disseminated diseases | N o | No | Encapsulated yeast |
| *Pneumocystis carinii* | Pulmonary to disseminated diseases | No (Commonly found in lung) | No | Cystis |
| *Candida albicans* | Thrush to disseminated diseases | Commensalism | Yes | Yeast, pseudohyphae, hyphae |
| *Aspergillus fumigatus* | Invasive aspergillosis(IA) Allergy (ABPA) | No (Environmental) | No | Conidia hyphae |

# Yeast Systemic mycosis: predisposing factors

- Neutropaenic patients following chemotherapy
- Oncology patients with immune suppression
- Acquired Immune Deficiency Syndrome caused by HIV infection
- Patients in intensive care (ICU)
- APACHE score > 10
- Renal dysfunction
- Haemodialysis
- Surgery for acute pancreatitis, or even possibly splenectomy
- Recurrent GIT perforation
- Hickmann catheters

# ...predisposing factors

## Some common associations between fungal organisms and disease conditions

| *Cryptococcus neoformans* | *Candida albicans* | *Candida (Torulopsis) glabrata* | *Zygomycetes* | *Aspergillus species* |
|---|---|---|---|---|
| Tuberculosis | Prolonged intravenous catheters | Immunosuppression | Leukemias | Corticosteroid therapy |
| Lymphoma | Prolonged urinary catheters | Diabetes mellitus | Corticosteroid therapy | Tuberculosis |
| Hodgkin's disease | Corticosteroid therapy | Hyperalimentation | Intravenous therapy | Immunosuppression |
| Corticosteroid therapy | Diabetes mellitus | Intravenous catheters | Severe burns | I.V. drug abuse |
| Immunosuppression | Hyperalimentation | | | |
| | Immunosuppression | | | |

## The new

Immunosuppression

- ✓Defective Innate
- ✓Neutropenia
- ✓Defective CMI

Immunoactivation

- ✓IRS
- ✓Hyper-IgE Syndrome
- ✓CMC
- ✓CGD

# Rapporto ospite/funghi
# Associazione simbiotiche

**Mutualism**

**Commensalism**

**Parassitism**

**Amensalism**

Pesce pagliaccio

*Il commensalismo è un' interazione simbiontica non obbligatoria fra due esseri viventi in cui uno approfitta del nutrimento o degli scarti dell'altro senza procurare sofferenza o disturbo. Un organismo tra i due trae dei benefici dall'altro e l'altro non è né danneggiato né aiutato.*

# The human microbiome

Only about **10%** of the cells in our bodies are truly human: **the vast majority are microbial**. Almost all of these bacteria are unculturable but molecular methods can give us a good glimpse of this diverse community.

nature
www.nature.com/nature
Vol 453 | Issue

## Who are we?

Efforts to catalogue and understand the h...
But the earlier Human Genome P...

"W ho are ...

gists are d... "Who are w... The 'we' re... that colonize t... trillions. Accor... at least a kilogram... biology that it is d... begin — which is w... up to characterize the hu... page 578).

...ple are ques-... prompt the changes ...weight, that could make them

...ment, however, researchers involved in the human ...e efforts can learn a valuable lesson from the genome experience. Simply put: be circumspect. Don't oversell the human microbiome until its medical promise has been established. Remember that the understanding of these microbial communities is still fragmentary, at best — and that it is far from established that the microbiota can be radically altered without upsetting the balance and causing harm, or that any alterations will last more than a few months. Indeed, attempts to understand the dynamics of gut colonization are still in their infancy (see page 581).

Microbiologists a... ...ed by this opportunity. So, too, are the food a... ...utical industries. When it comes to profitable applicati... to human health, the microbiome could well offer distinct advantages over the more famous genome. Human genes are notoriously difficult and risky to tamper with. But, in theory at least, the microbiome should be relatively easy to change by the selective addition or removal of bacterial species, or by altering their genetic components. This idea has some basis. Antibiotics and 'probiotic' foods have already been shown to calm inflammatory bowel diseases in some instances. In this issue, for example, researchers show how intestinal inflammation can be reduced by a single molecule produced by a gut bacterium (see pages 602 and 620). And there is increasing acceptance that certain foods, or the bacteria contained in them, can alter gut microbiota in ways that are beneficial to health in general.

The new appreciation of the microbiome comes just as some observers have started to question whether the human genome can deliver on its once-hyped promises to tackle disease. To take just one

"Don't oversell the human microbiome until its medical promise has been established."

In the meantime, microbiologists should celebrate their quest to map, catalogue and understand the human microbiome for the inspiring saga it is. Certainly there is food for thought in the fact that everyone has inside them exotic environments that support communities as diverse as any rainforest. There is a unique ecological perspective on food itself, and the effects that different foodstuffs, such as processed versus unprocessed ones, have on these environments.

There is a compelling new take on humankind's place in the world — a realization that "Who am I?" cannot be fully answered until it is fully understood who 'we' are.

An opportunity to track gut colonization.

with an endoscope to pinch off biopsies of the intestinal wall with its microbial community intact. Yellow faeces and glistening, pink skin are signs that the new intestine has successfully taken. "That is beautiful stuff," says Stuart Kaufman, medical director of the intestinal-transplantation programme at Georgetown. "We live for poop like this."

The adult samples are also beautiful stuff for researchers who want to chart the arrivals of the different bacterial species. The material is put ...

requires following more patients over longer times, and intestinal transplants are rare.

A different bloody, messy procedure arrives all too often though: a birth. Here, too, researchers see a fascinating opportunity to explore how microbes colonize a gut, one thought to be sterile inside the womb. During birth and in the hours after, babies can swallow bacteria from the mother's birth canal, faeces and from whatever environment they arrive in.

No one knows yet whether bacteria move into a baby's spanking new innards in the same way they grab a foothold in a used, adult transplant. Much of what scientists know about the former process has been learned from a study of Relman's, in which he and his colleagues collected used nappies from 14 babies beginning with the first stool after birth and at regular intervals throughout the first year of life[1]. What they found mirrored some of the discoveries in the transplanted intestines: every baby's microbiota is unique but dynamic, with different populations of bacterial species shifting in abundance. And as in the transplant study, the babies showed a succession of colonization, with facultative bacteria settling in first, followed by a more complex and diverse population.

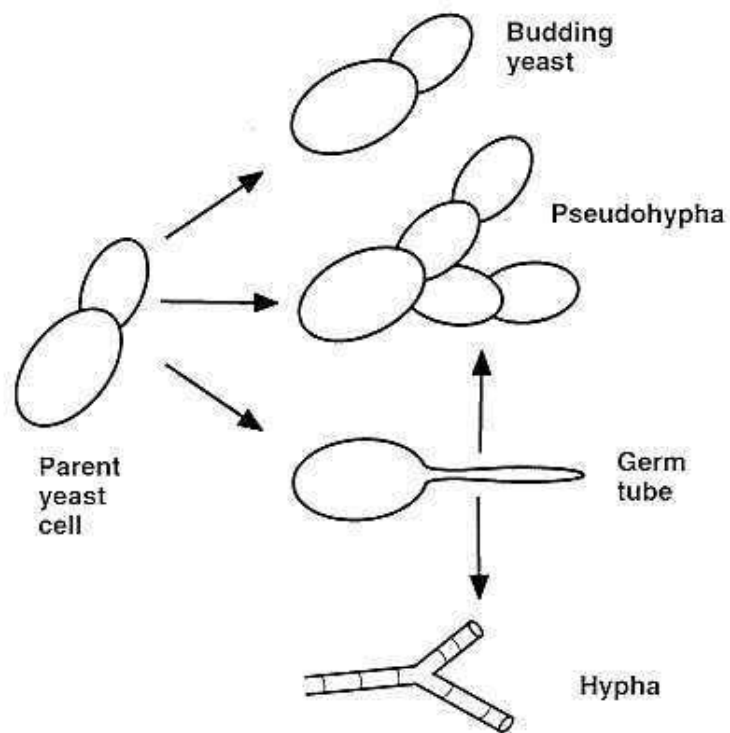
# *Candida albicans*: il ritratto di un opportunista

Budding yeast

Pseudohypha

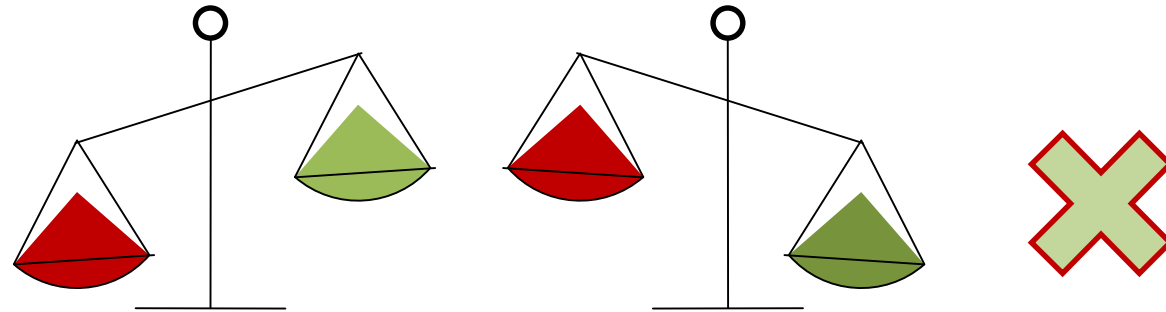
Parent yeast cell

Germ tube

Hypha

# *Candida albicans*: a successful human commensal

- **Extremely successful commensal and pathogen of human beings**
- **Rarely found in environmental niches**
- **It has to resist the constant surveillance of the immune system**
- **The host affects the *balance* between commensalism and pathogenicity**

***Candida albicans*** **in the gut**

# Antifungal Defensive Strategies

| | Resistance | Tolerance | Ignorance |
|---|---|---|---|
| **Benefits** | Control of fungal burden | Limited tissue damages | ? |
| **Risks** | Inflammation, Para-inflammation | Infection,Fungal persistency | ? |
| **T helper** | ? | ? | - |
| **Cytokines** | ? | ? | - |
| **Key-role** | ? | ? | - |

# Fungi and Immune system

Innate immunity
Fungus
Mucosal surface
PRR
Opsonin
Neutrophil
Macrophage
Immature dendritic cell
Maturation
Innate immune functions such as phagocytosis and neutrophil degranulation
Inflammatory response
IL-10
IL-12
IL-18
Draining lymph node
Mature dendritic cell
Antigen presentation
TCR
MHC
T cell
T cell
B cell
B cell
Antibody production
IFN-γ
TNF
$T_H1$
IL-12
IL-4
IL-5
$T_H2$
IL-4
Lymphocyte activation and cytokine release
TGF-β
IL-10
$T_{Reg}$
IL-10
Adaptive immunity

*Romani L.*

*JANUARY 2004 | VOLUME 4*

# Innate Immunity

## 1. Meccanismi costitutivi di difesa innata

- Cute, mucosa
- Antagonismo microbico

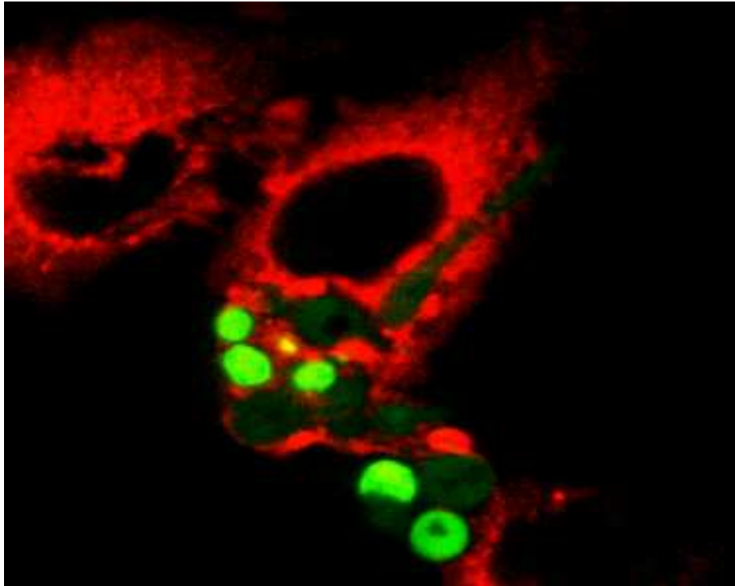
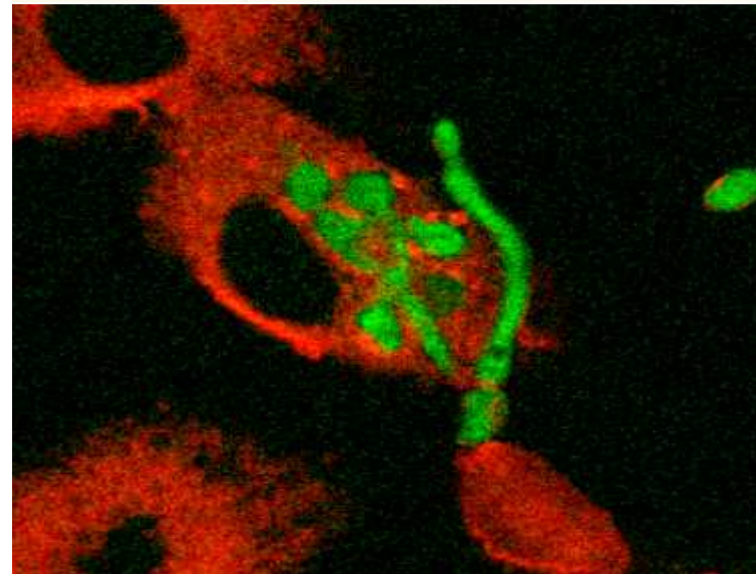
## 2. Meccanismi effettori

- Polimorfonucleati (PMN)
- Mononucleati (Monociti, macrofagi)
- Cellule dendritiche
- NK
- Non-haematopoietic cells (epithelial cells)

## 3. Meccanismi ossidativi e non ossidativi

- Defensine, collectine
- NADPH OSSIDASI

## 4. Fattori umorali

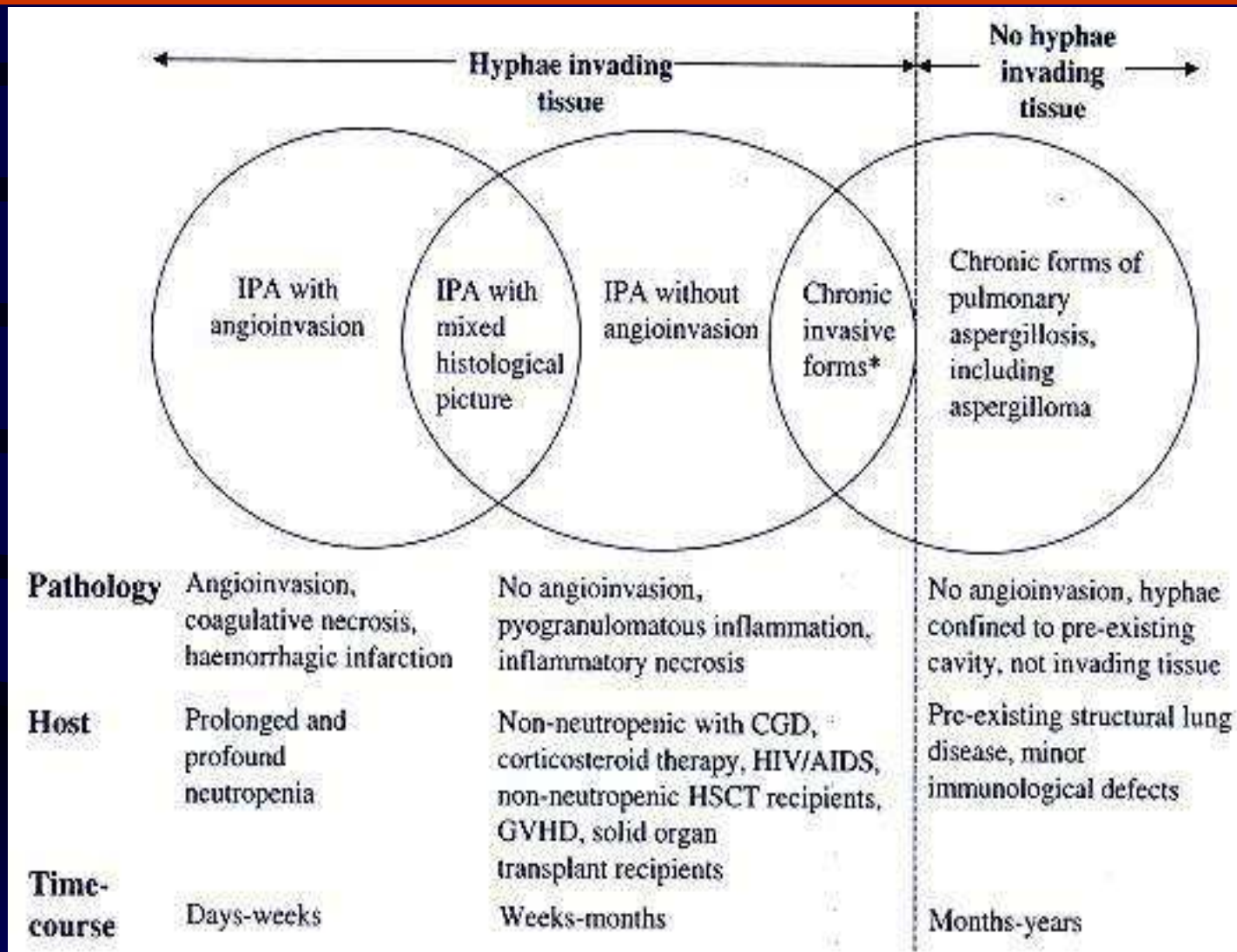
# Dendritic cells

*Candida* Yeast

*Candida* Hyphae

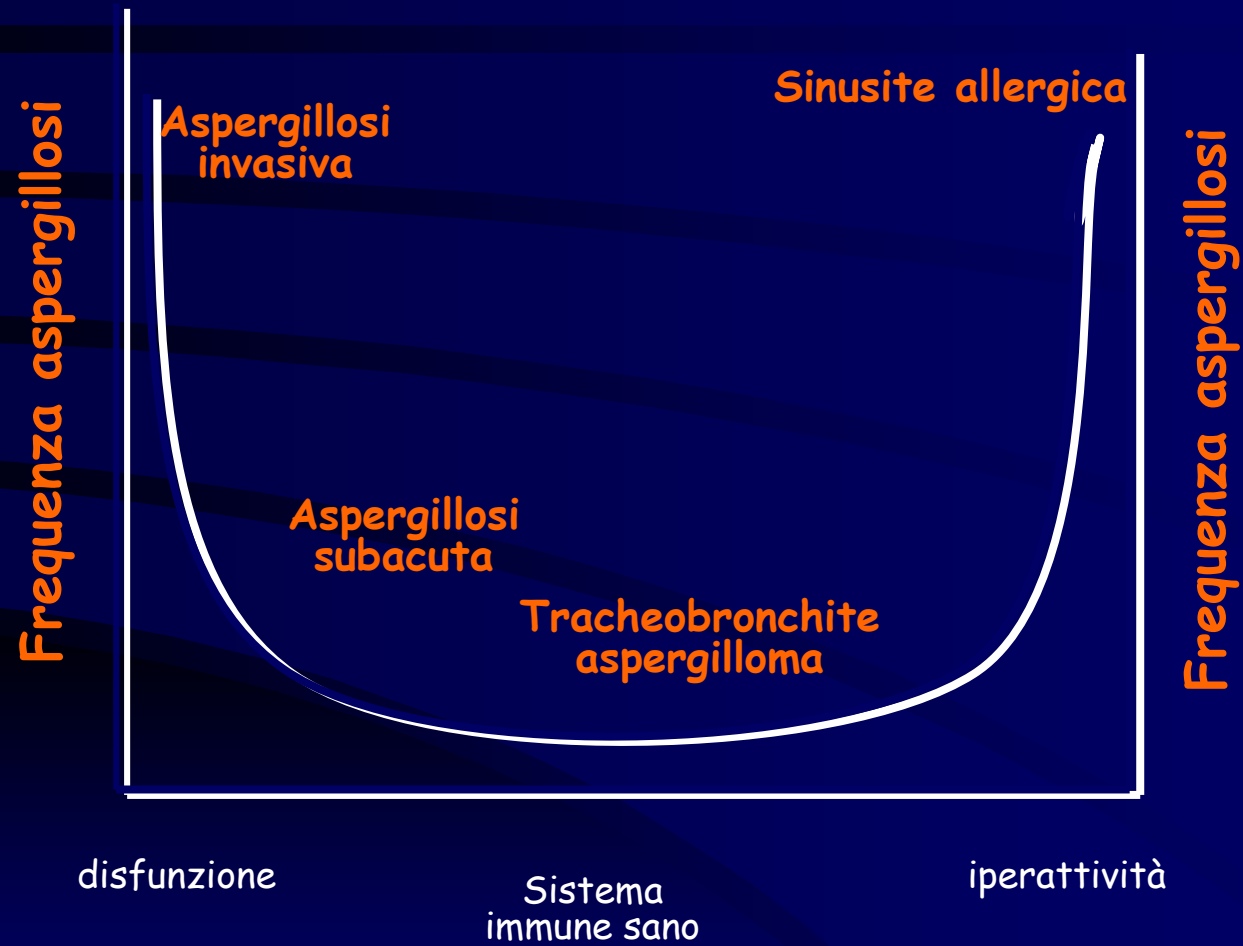
# Interazioni ospite-parassita

- Le infezioni micotiche si stabiliscono all'interno di una rete

  DANNO- RISPOSTA.
- L'infezione quindi è l'acquisizione di un potenziale patogeno da parte di un ospite, ma non necessariamente esita in "malattia".
- Si ha malattia quando l'interazione OSPITE-FUNGO produce un danno sufficiente da distruggere la normale omeostasi e/o diventare apparente clinicamente.

- Il risultato dell’infezione può quindi essere:
  - Eliminazione del microrganismo
  - Infezione asintomatica
  - Malattia latente o evidente

# Invasive aspergillosis : update on conventional diagnosis

Hope, WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 2005, 43: S 207-238

# Interazione ospite microrganismo

# Fattori di vitalità

- Permettono al fungo di far fronte alle condizioni ambientali estreme:
  - Presenza di melanina, di caroteni
  - Ispessimento della parete cellulare
  - Termotolleranza

  - Questi fattori da soli non sono in grado di dare micosi

- **Agenti infettivi adattati**: funghi che hanno stabilito un rapporto con l’organismo in modo da avere massimo grado di riproduzione e dispersione, ma l’ospite tende a minimizzare il danno dell’infezione. Quanto più elevato è il grado di adattamento a tale condizione tanto più basso è il grado di virulenza che si sviluppa in una condizione benigna.
- **Patogeni**: se causano danni visibili all’ospite

- Molti dei funghi che sono adattati ai mammiferi e che causano infezione sistemica sono DIMORFICI; esibiscono due forme vegetative, la forma tissutale e quella ambientale.
- La forma tissutale non è indispensabile al fungo, ma viene usata dal fungo come strategia di propagazione e di sopravvivenza.
- Solo le proprietà che aumentano la penetrazione e la sopravvivenza possono essere considerate

**STRATEGIE ECOLOGICHE**

- PATOGENO in senso evoluzionistico, è quindi considerato quel fungo che adotta strategie ecologiche basate sull’utilizzazione di un ospite animale e che quindi esibiscono

fattori di virulenza

- Funghi opportunisti: agenti casuali di malattia.

la vitalità fungina e le difese umane sono più o meno in equilibrio, ma quando l’immunità cellulare innata diventa inefficace, tale bilanciamento si sposta verso il vantaggio fungino e può aver luogo la sepsi.

**Tabella 64.6 Relazioni con l'ospite dei funghi.**

| Saprofita | Commensale | Endosaprofita | Patogeno facoltativo | Patogeno obbligato | Patogeno adattato all'uomo |
|---|---|---|---|---|---|
| Nicchia ecologica fuori dall'uomo | Nicchia ecologica nell'uomo | Nicchia ecologica nell'uomo | Strategia di disseminazione: trasmissione ambiente/uomo | Strategia di disseminazione: trasmissione uomo/uomo | Strategia di disseminazione: trasmissione uomo/uomo |
| Ospite sano: forte difesa non-specifica | Nessun contatto con il sistema immunitario | Ospite sano: modesto impegno del sistema immunitario | Ospite sano: moderata virulenza | Ospite sano: alta virulenza | Ospite sano: bassa virulenza |
| Ospite immuno-compromesso: opportunismo | | Ospite immuno-compromesso: opportunismo | | | |
| Esempio: *Aspergillus fumigatus** | Esempio: *Malassezia furfur** | Esempio: *Candida albicans** | Esempio: *Histoplasma capsulatum*** | Esempio: *Trichophyton verrucosum*** | Esempio: *Trichophyton rubrum*** |

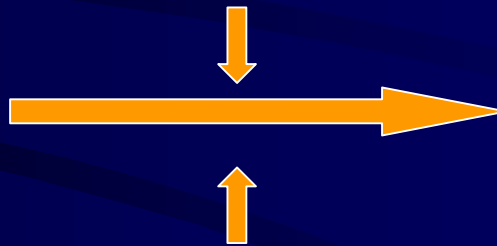
* La "fitness" del microrganismo è aumentata dal rapporto con l'uomo: fattori di vitalità.
** La "fitness" del microrganismo è aumentata dal rapporto con l'uomo: fattori di virulenza.
[Da: G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras, *Atlas of Clinical Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.]

# Esempi di Studi sulla virulenza sono stati fatti su:

- *Cryptococcus neoformans* (patogeno opportunista)
- *Candida albicans* (endosaprofita/ opportunista)
- *Malassetia furfur* (commensale)
- *Aspergillus fumigatus* (saprofita /opportunista)

# PATOGENESI DELLE CANDIDOSI

**FATTORI CHE AUMENTANO LA VIRULENZA DI *CANDIDA***

**COLONIZZAZIONE ASINTOMATICA**

**CANDIDOSI SINTOMATICA**

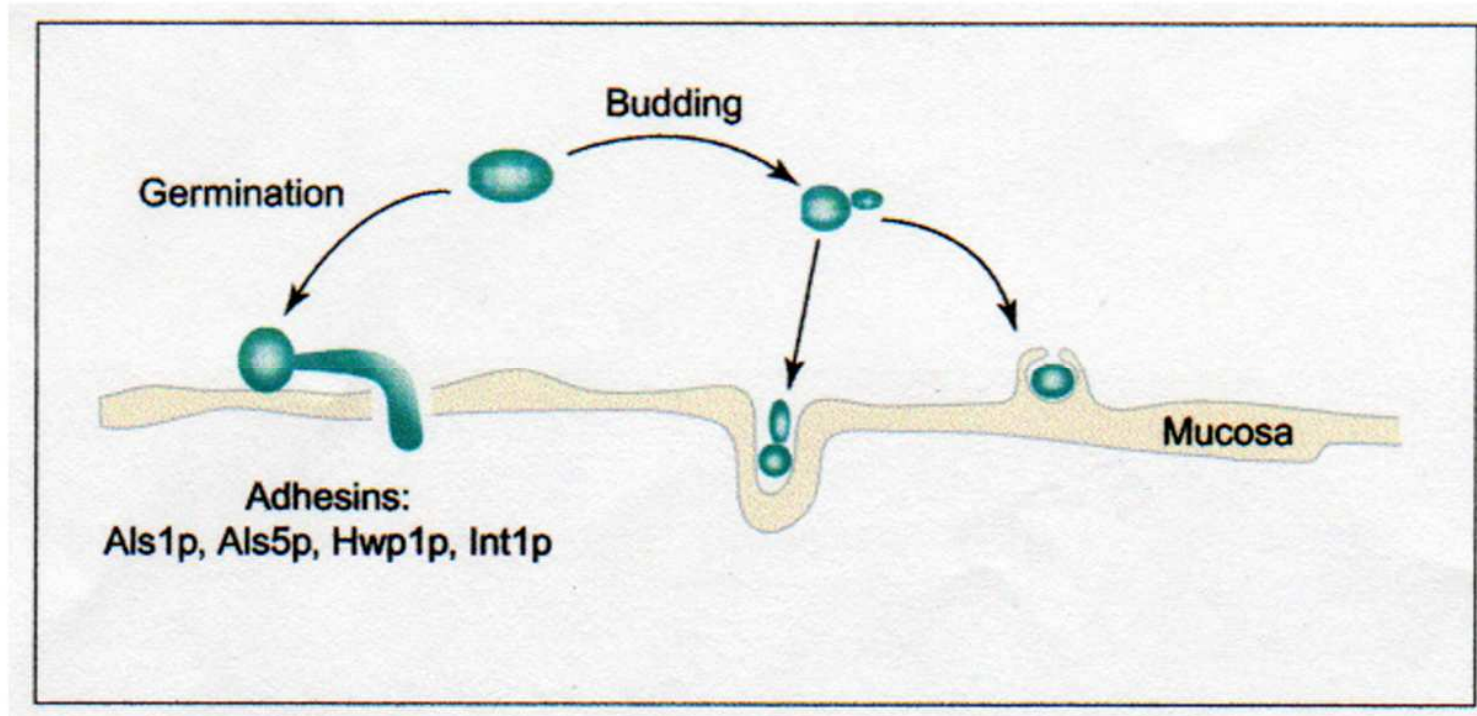
**DIMINUZIONE DEI MECCANISMI DI DIFESA**

# PRINCIPALI FATTORI DI VIRULENZA DI *CANDIDA*

- **ADESIONE**
- **DIMORFISMO**
  **VARIAZIONEANTIGENICA**
- **SECREZIONE DI ENZIMI,**
  **ASPARTYL PROTEINASI**
- **SWITCHING**

# PRINCIPALI FATTORI DI VIRULENZA DI *CANDIDA*

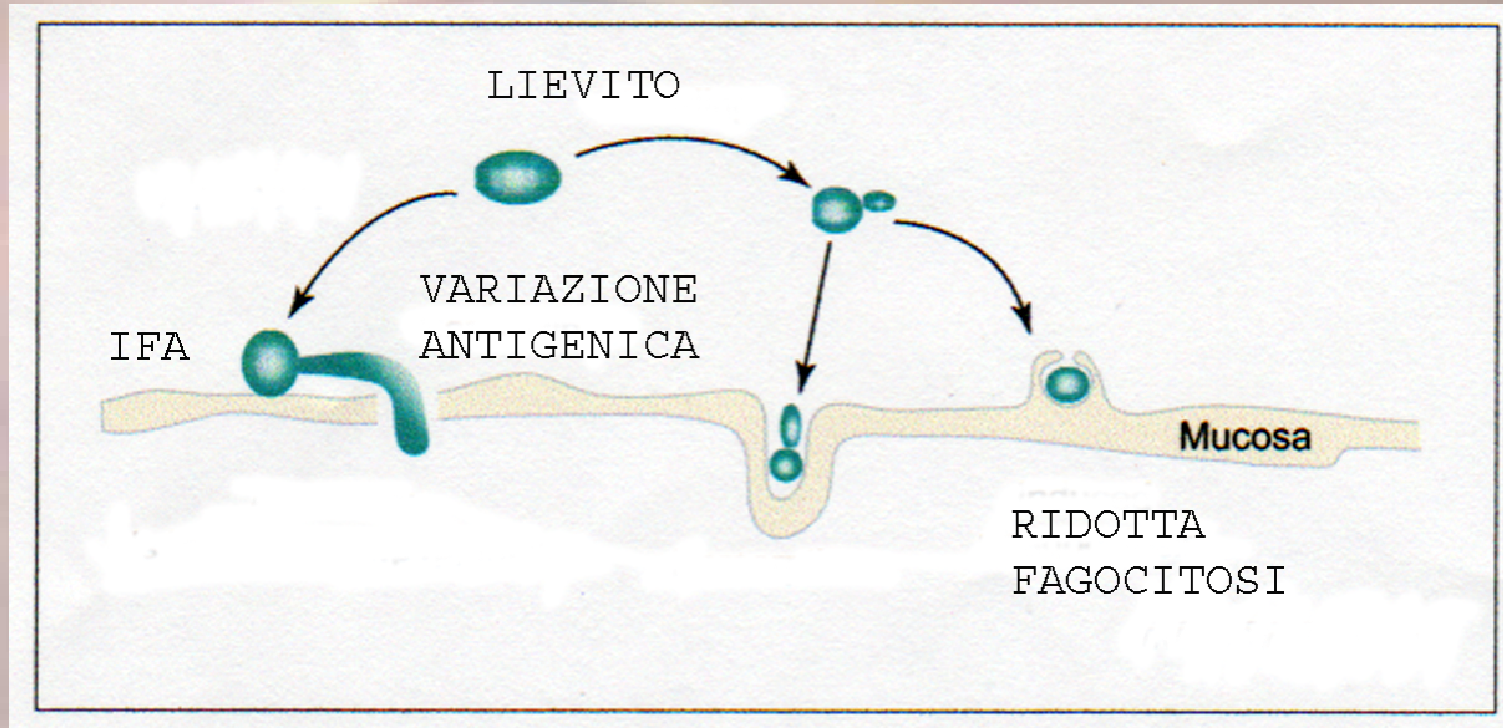
- **ADESIONE**
- **DIMORFISMO**
  **VARIAZIONEANTIGENICA**
- **SECREZIONE DI ENZIMI,**
  **ASPARTYL PROTEINASI**
- **SWITCHING**

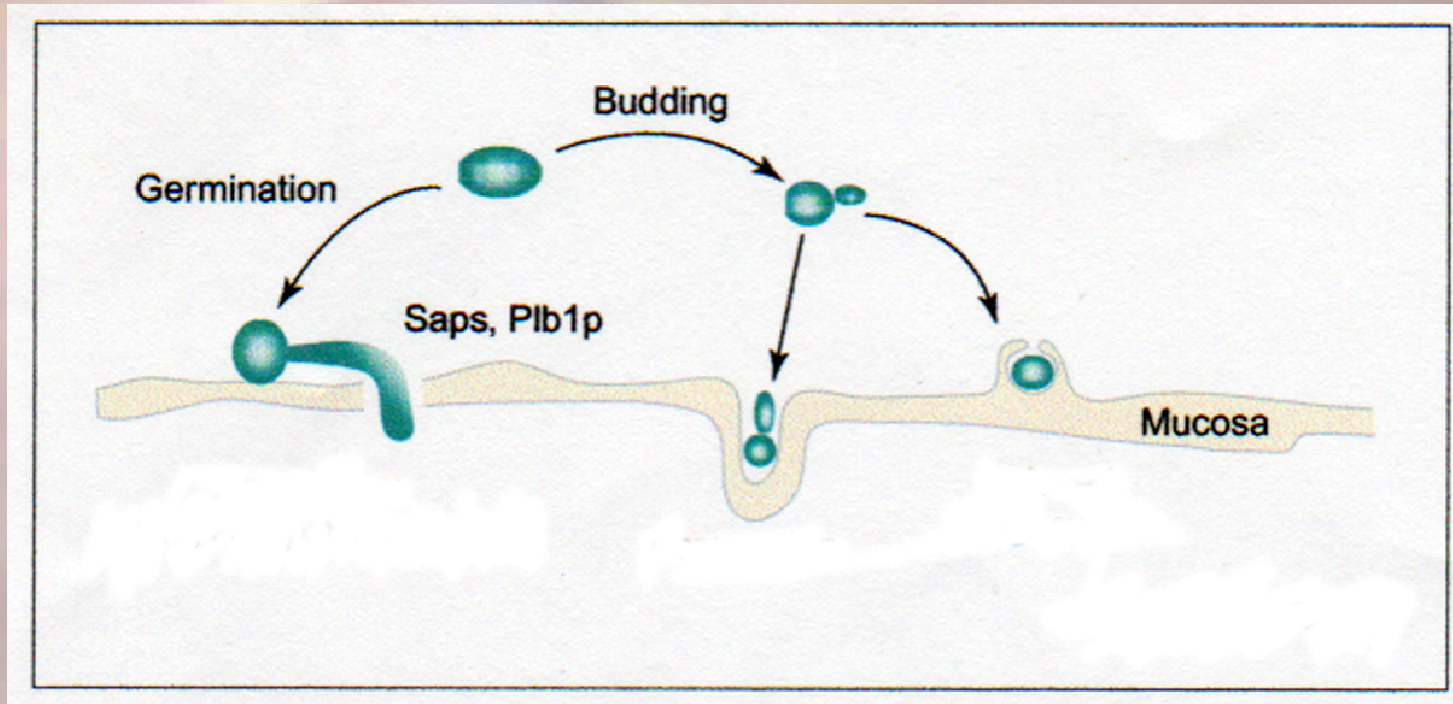
# ADESIONE

**L'adesione è la prima fase nelle candidosi mucocutanee.**
**L'adesione delle cellule di Candida alle cellule dell'ospite,soprattutto alle cellule epiteliali è essenziale per la colonizzazione previene o riduce l'eliminazione di Candida da parte dell'ospite.**
**Importante il ruolo di mannoproteine per l'attaccamento di Candida alle cellule epiteliali**

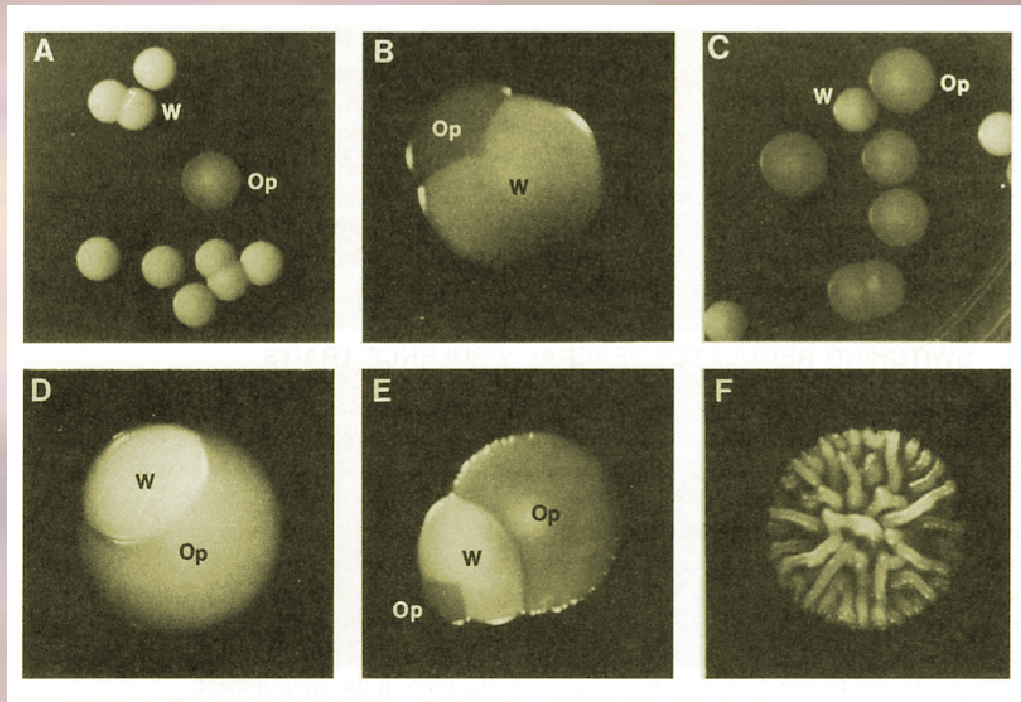
# ADESINE DI C. ALBICANS E C.GLABRATA

| ADESINE | SUBSTRATI | MUTANTI | | REFERENZE |
|---|---|---|---|---|
| | | ADERENZA IN VITRO | VIRULENZA 1) | |
| ALS 1p (agglutinin-like sequence proteins) | CELLULE ENDOTELIALI | RIDOTTA | RIDOTTA | Fuy et al. Infect Immun. 1998, 66, 1783 |
| ASL5p (agglutinin-like sequence proteins) | FIBRONECITINA | RIDOTTA | RIDOTTA | Gaur NK et al. Infect. Immun.1999, 67, 6040 |
| HWP 1 p (Hyphal wall protein) | CELLULE EPITELIALI BOCCALI | RIDOTTA | RIDOTTA | Staab. J.H.F. at al. Science 1999, 283, 1535 |
| INT 1p (Integrin-like protein) | CELLULE EPITELIALI | RIDOTTA | RIDOTTA | Gale et al. Science 1998,279, 1355 |
| MNT 1p (Mannosyl tranferase) | CELLULE EPITELIALI BOCCALI | | | |

1) MODELLO DI INFEZIONE SISTEMICA NEL TOPO

# DIMORFISMO

**Transizione dalla forma a lievito alla forma ifale. Determina cambiamenti nella composizione antigenica della parete cellulare e resistenza alle difese dell'ospite.**

# SECREZIONI DI ENZIMI PROTEOLITICI

**Proteinasi, fosfolipasi e lipofosfolipasi questi enzimi idrolizzano degradano o modificano molecole e strutture dell'ospite e quindi facilitano la colonizzazione delle mucose.**

# SWITCHING

## SWITCH BIANCO/OPACO NEL CEPPO *C.albicans* WO -1

**Capacità di cambiare rapidamente il fenotipo. Variazioni morfologiche nella colonia di *C.albicans*. Queste variazioni descritte come sistema swich bianco/opaco avvengono con alta frequenza.**
**Quando una colonia bianca diventa opaca contiene cellule individuali che si modificano ed acquistano nuove caratteristiche di virulenza.Tra queste vi sono: maggiore aderenza, aumentata capacità di formare micelio, maggior secrezione di proteinasi, minore suscettibilità agli antimicotici, aumentata variabilità antigenica. Queste variazioni fenotipiche possono essere importanti nella patogenesi, infatti sono associate a cambiamenti nell'espressione genica. Il fenomeno dello switching può includere diversi attributi della virulenza di *Candida* e rende le cellule più flessibili e più adattabili alle condizioni "ostili dell'ospite".**

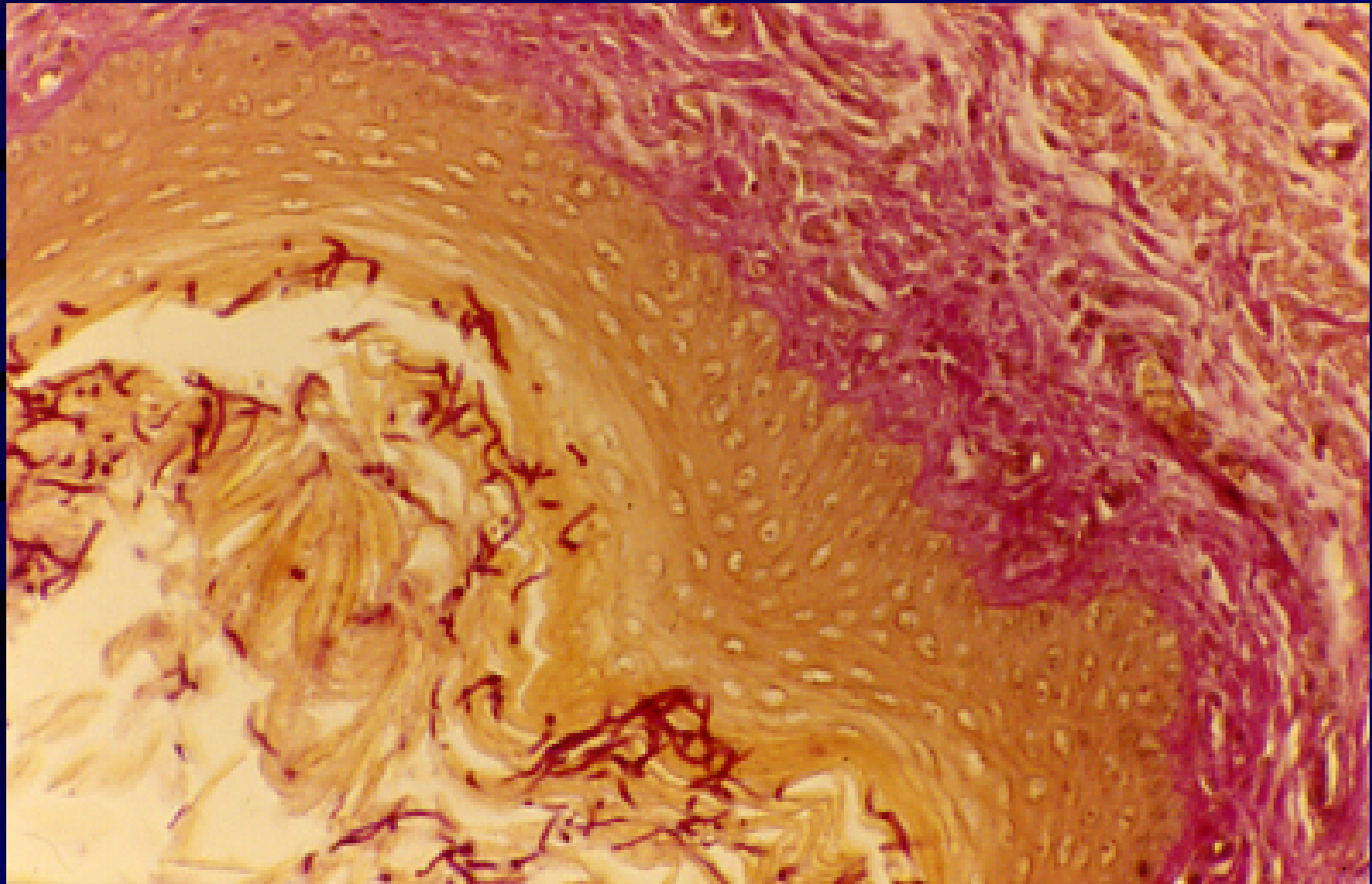
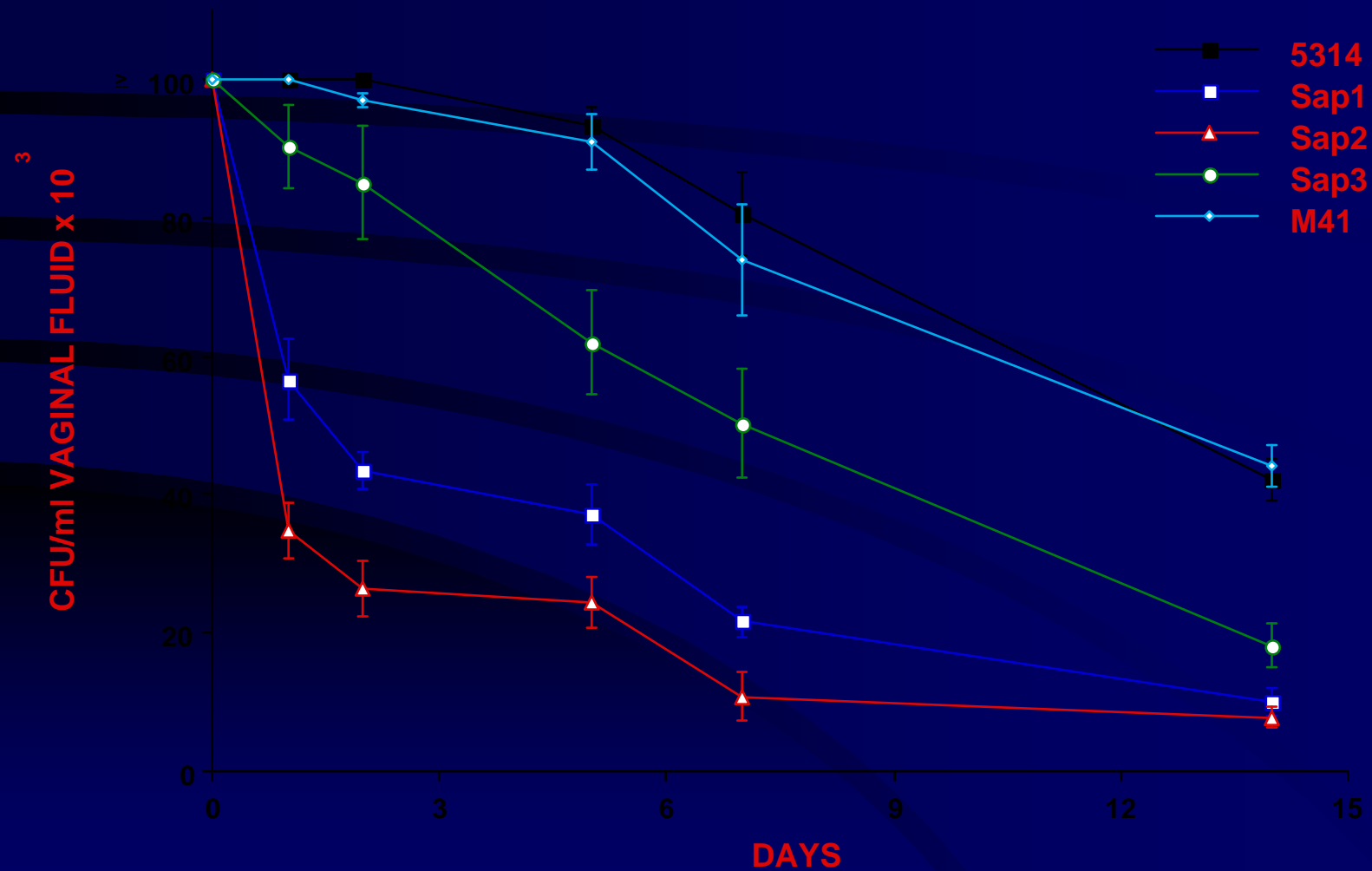
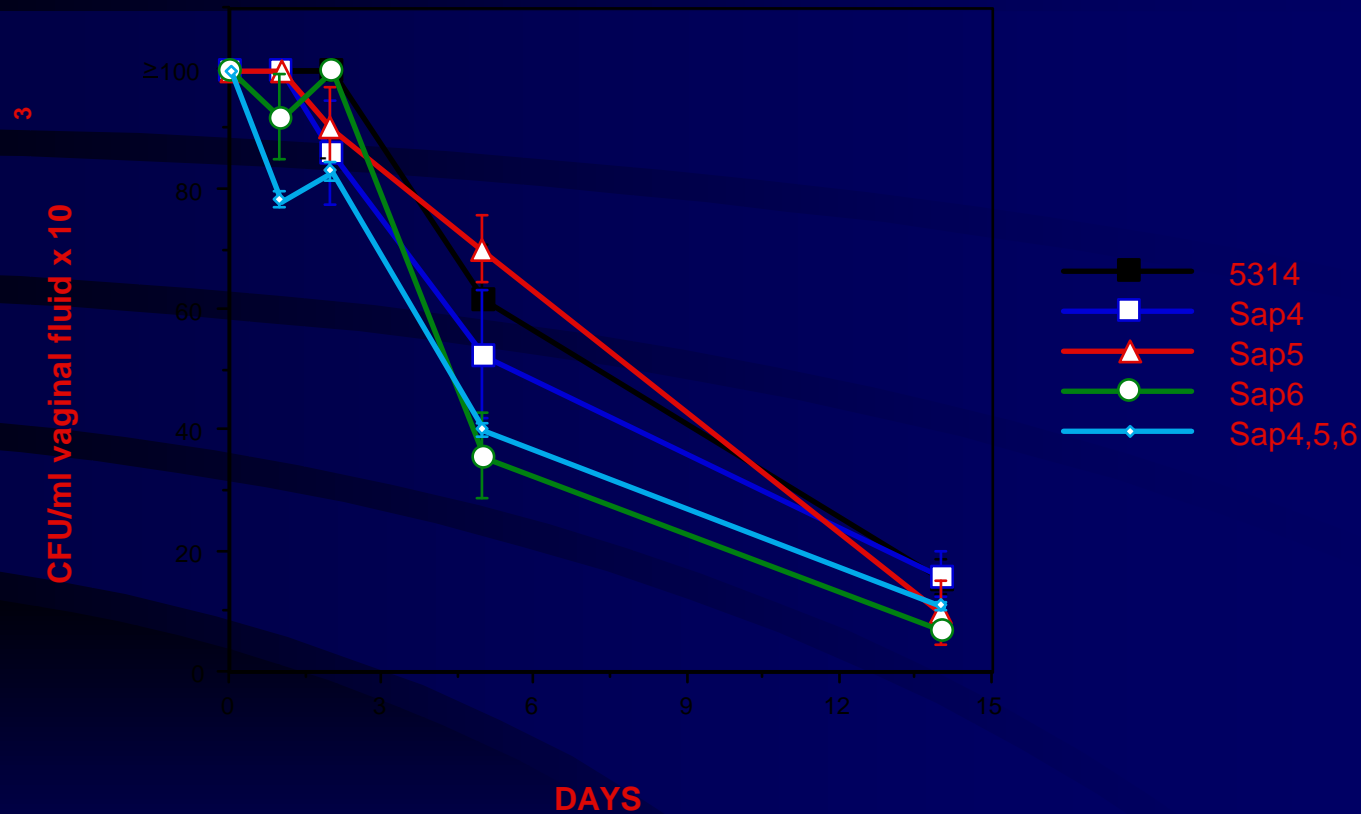
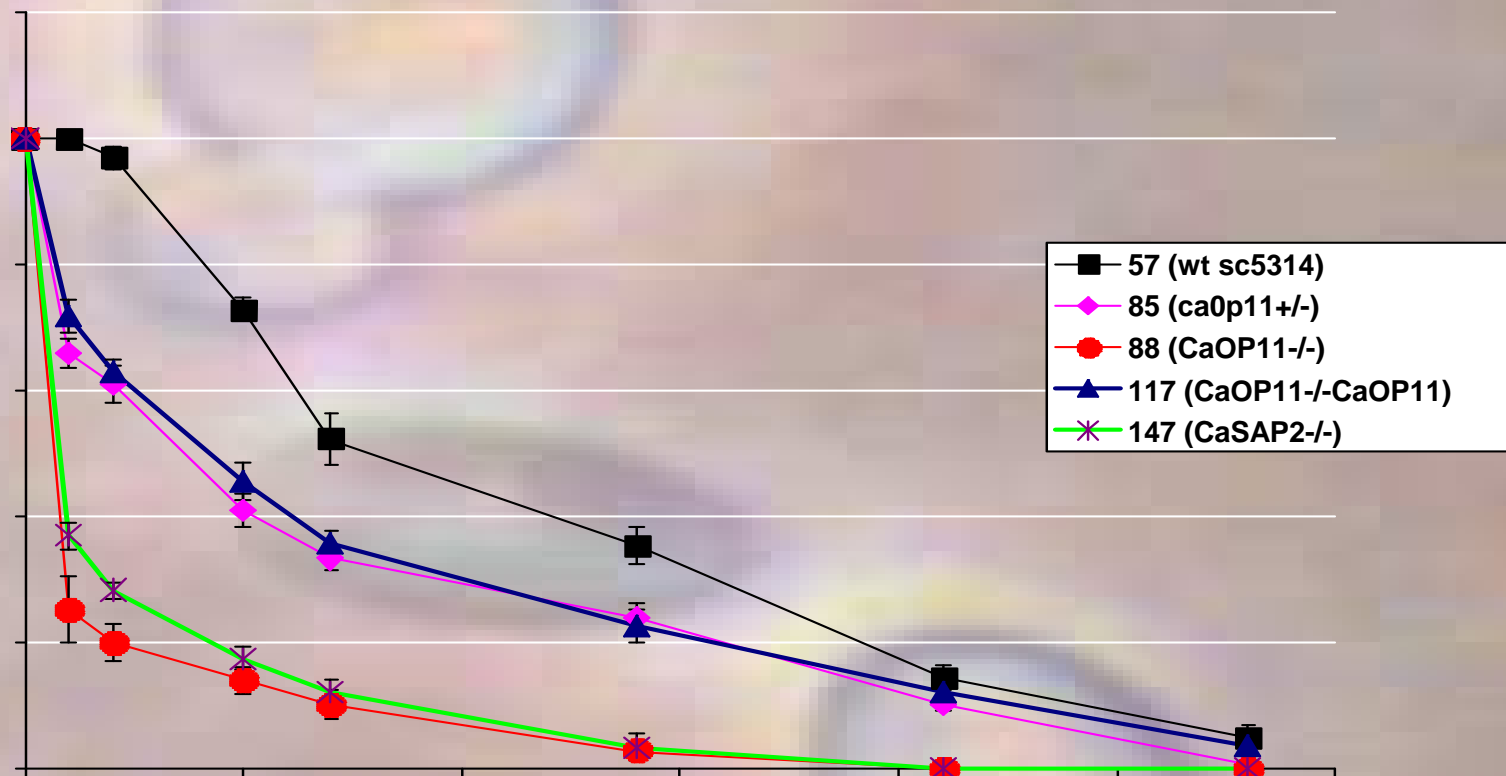
# PROTEINASI

# EVIDENZA CLINICA DI UNA CORRELAZIONE TRA SECREZIONE DI PROTEINASI E CANDIDIASI VULVOVAGINALE

- **Isolati di *C.albicans* e *C.parapsilosis* altamente proteolitici sono stati più frequentemente isolati da casi di vaginite che da carrier.**
- **E' stato evidenziato, mediante reazioni immunologiche (ELISA, WESTERN BLOT) con un anticorpo monoclonale che l'enzima viene secreto in vivo durante l'infezione, nel fluido vaginale, in forma enzimaticamente attiva e in maggiore concentrazione in pazienti con vaginite rispetto ai carrier.**

# VAGINITE SPERIMENTALE NELLA RATTA

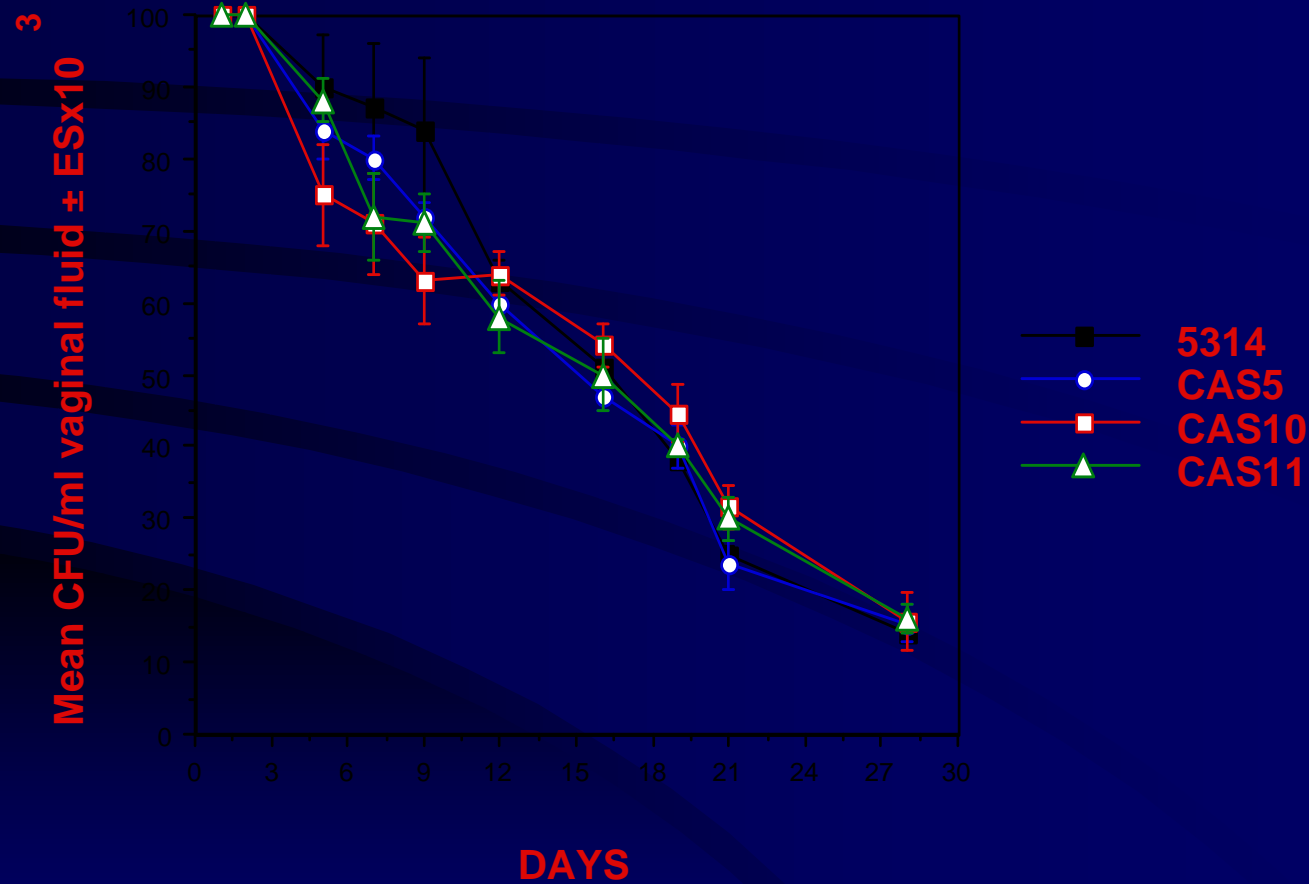
•Ratte wistar, ovariectomizzate, vengono mantenute in pseudoestro mediante estrogeni (benzoato di estradiolo, 0,5 mg sottocute). Gli animali vengono inoculati in vagina con $10^7$ cellule (0,1 ml) di lievito. Il fluido vaginale viene prelevato da ciascun animale ogni due giorni per determinare il numero di U.F.C. di *C. albicans*. Alcune aliquote del fluido vaginale vengono esaminate microscopicamente, altre vengono impiegate per analisi sierologiche.

Da: De Bernardis F., Lorenzini R., Cassone A. Rat model of Candida vaginal infection. Chapter 89 in Handbook of Animal Model of Infection. Edited by Oto Zak and Merle A.Sande. 1999 Academic press.New York.

# QUANTIFICATION OF VAGINAL COLONIZATION BY PROTEINASE (Sap) DEFICIENT MUTANTS OF *C. ALBICANS*

# QUANTIFICATION OF VAGINAL COLONIZATION BY PROTEINASE (Sap) DEFICIENT MUTANTS OF *C. ALBICANS*

# Vaginal colonization in rats intravaginally inoculated with *C.albicans* mutants

# **DIMORFISMO DI *C.ALBICANS***

- Valutazione di patogenicità di mutanti con i geni pHR1 e pHR2, responsabili della morfogenesi di *C.albicans* pH dipendente, distrutti.

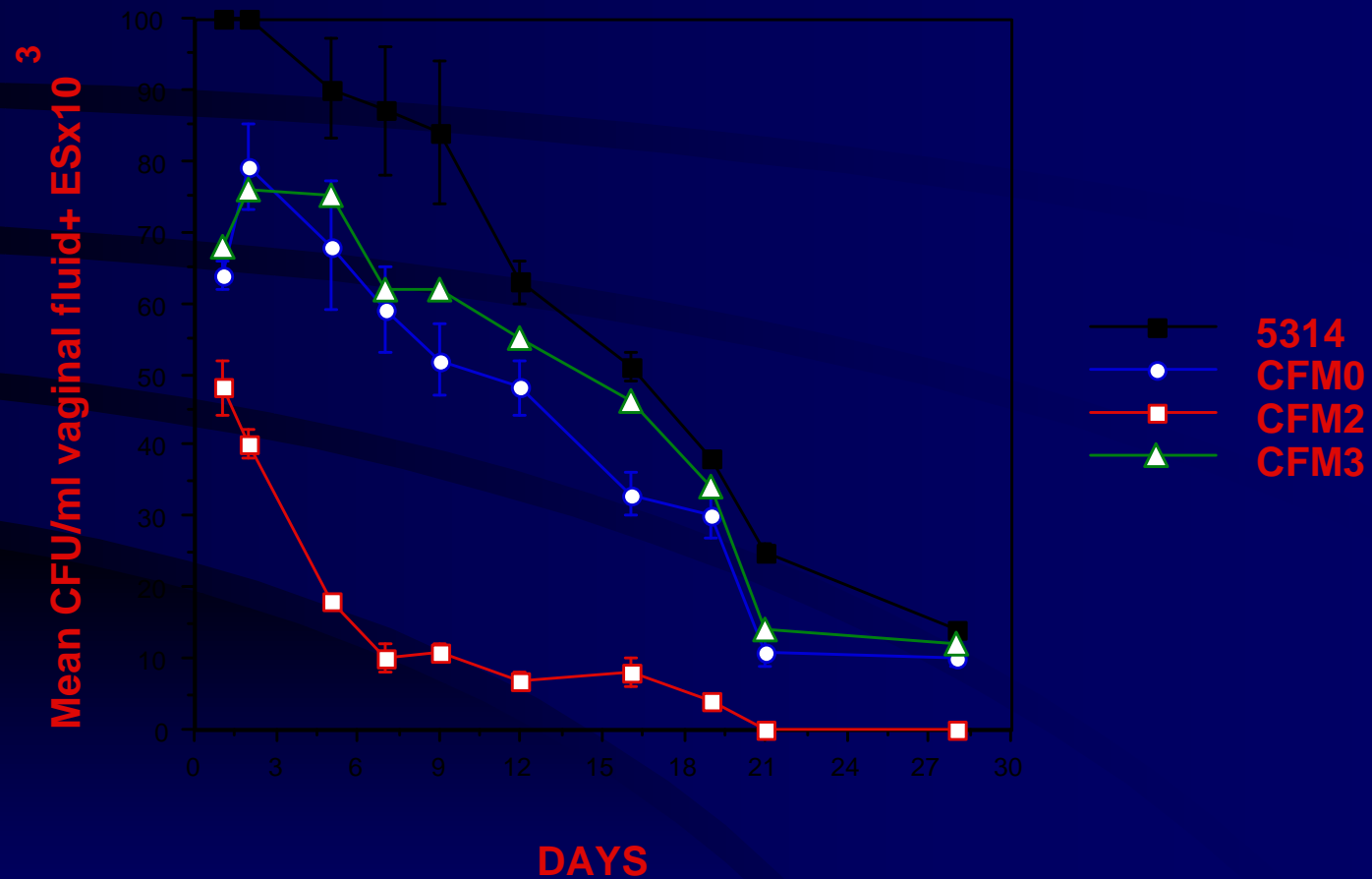
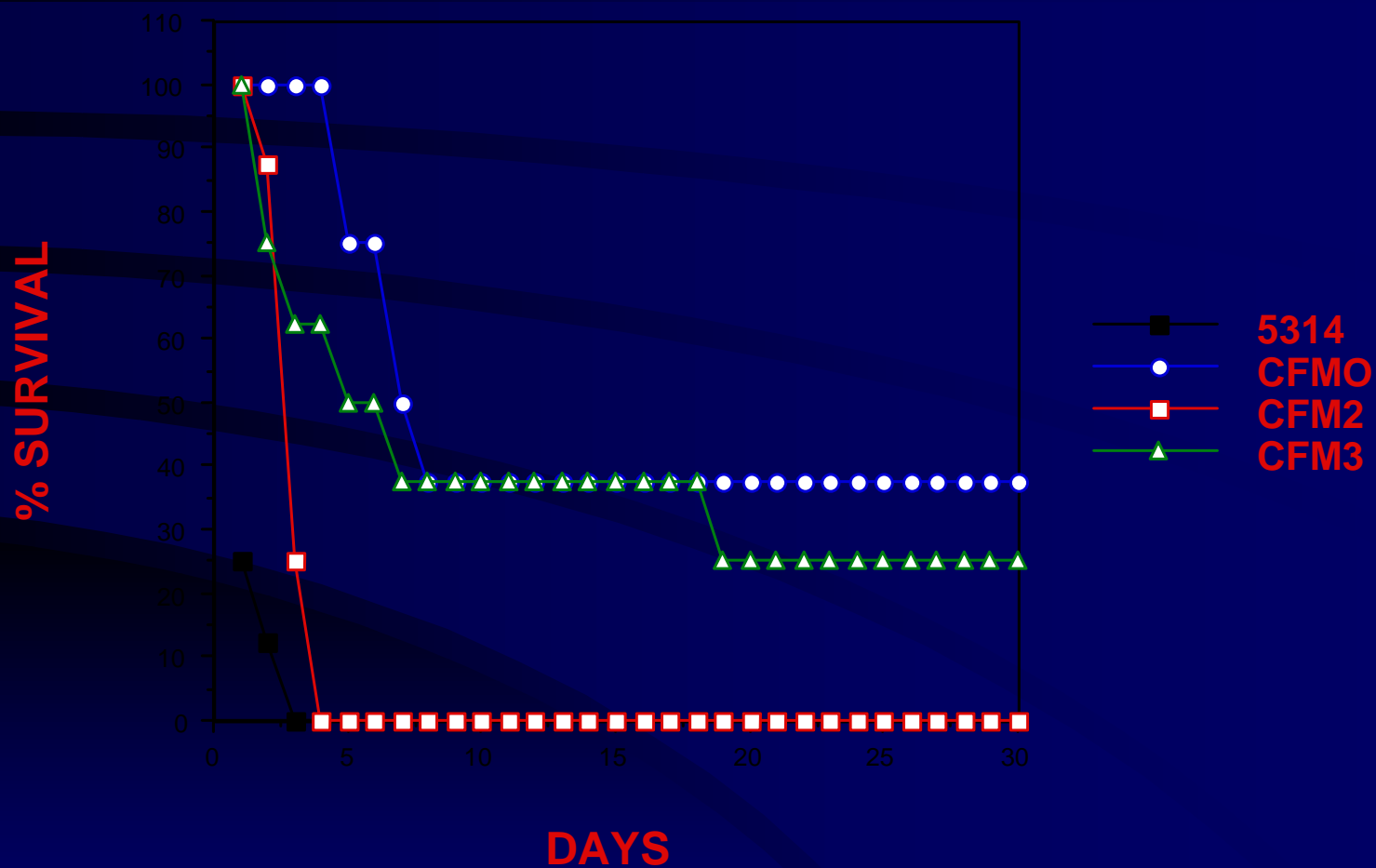
# MUTANTE DI *C.ALBICANS* pHR1

- Un mutante di *C.albicans* con il gene pHR1 distrutto mostra difetti di morfogenesi a pH 7,5.
- Il mutante pHR1/pHR1 è risultato meno virulento del ceppo parentale pHR1+ nel modello di infezione sistemica nel topo;
- Abbiamo valutato la patogenicità di questo mutante nel modello di vaginite nelle ratte
- **Fonzi et al**. Molecular and Cellular Biology, 1995, 15, 601.
- **Fonzi et al.** Infection and Immunity, 1995, 63, 4528.

# QUANTIFICATION OF VAGINAL COLONIZATION BY pHR1 DEFICIENT MUTANTS OF *C. ALBICANS*

# MUTANTE DI *C.ALBICANS* pHR2

- Un mutante di *C.albicans* con il gene pHR2 distrutto mostra difetti di morfogenesi a pH 4 - 5,5.
- Abbiamo valutato la patogenicità di questo mutante nel modello di vaginite nelle ratte.

De Bernardis et al. Infection and Immunity 1998,66,3317

# QUANTIFICATION OF VAGINAL COLONIZATION BY pHR2 DEFICIENT MUTANTS OF *C. ALBICANS*

# SURVIVAL OF CD2F1 MICE FOLLOWING INTRAVENOUS CHALLENGE WITH pHR2 DEFICIENT MUTANTS OF *C.ALBICANS*

# pH-REGULATED GENES, MORPHOGENESIS AND VIRULENCE

**pHR1**

Its expression is required to form hyphae at pH 7.5

- Required for systemic candidiasis
- Not required for vaginal candidiasis

**pHR2**

Its expression is required to form hyphae at pH 4-5.5

- Not required for systemic candidiasis
- Required for vaginal candidiasis

# FATTORI DI VIRULENZA DI *CANDIDA*

# CONCLUSIONI

I risultati di questi studi evidenziano che:

- **La secrezione di proteinasi può essere un importante fattore di virulenza nella vaginite da *C.albicans*.**
- **Alcuni geni della proteinasi di *C.albicans* SAP1, SAP2 e SAP3 vengono espressi in vivo e possono essere coinvolti nell'infezione vaginale.**
- **La transizione dimorfica di *C.albicans* favorisce la colonizzazione vaginale**
- **Geni associati al dimorfismo, la cui espressione è regolata dal valore del pH, vengono espressi in modo differenziale nella vaginite e la loro distruzione è rilevante per la patologia vaginale da *C.albicans*.**

# RUOLO DEL BIOFILM NELLA PATOGENESI DELLE CANDIDOSI

# Infezioni associate ai cateteri venosi centrali

- E’ stato stimato che si ricorre al loro impianto nel 30-50% dei pazienti ospedalizzati.
- Le infezioni correlate all’impianto nei pazienti di un dispositivo intravascolare rappresentano il 90% delle infezioni ematiche nosocomiali.
- Tali infezioni comportano:

 il prolungamento del ricovero ospedaliero

l’aumento dei costi di degenza

e un associato aumento di morbilità e mortalità

# Microrganismi implicati

- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus aureus*

  ed altri Stafilococchi coagulasi-negativi

60%

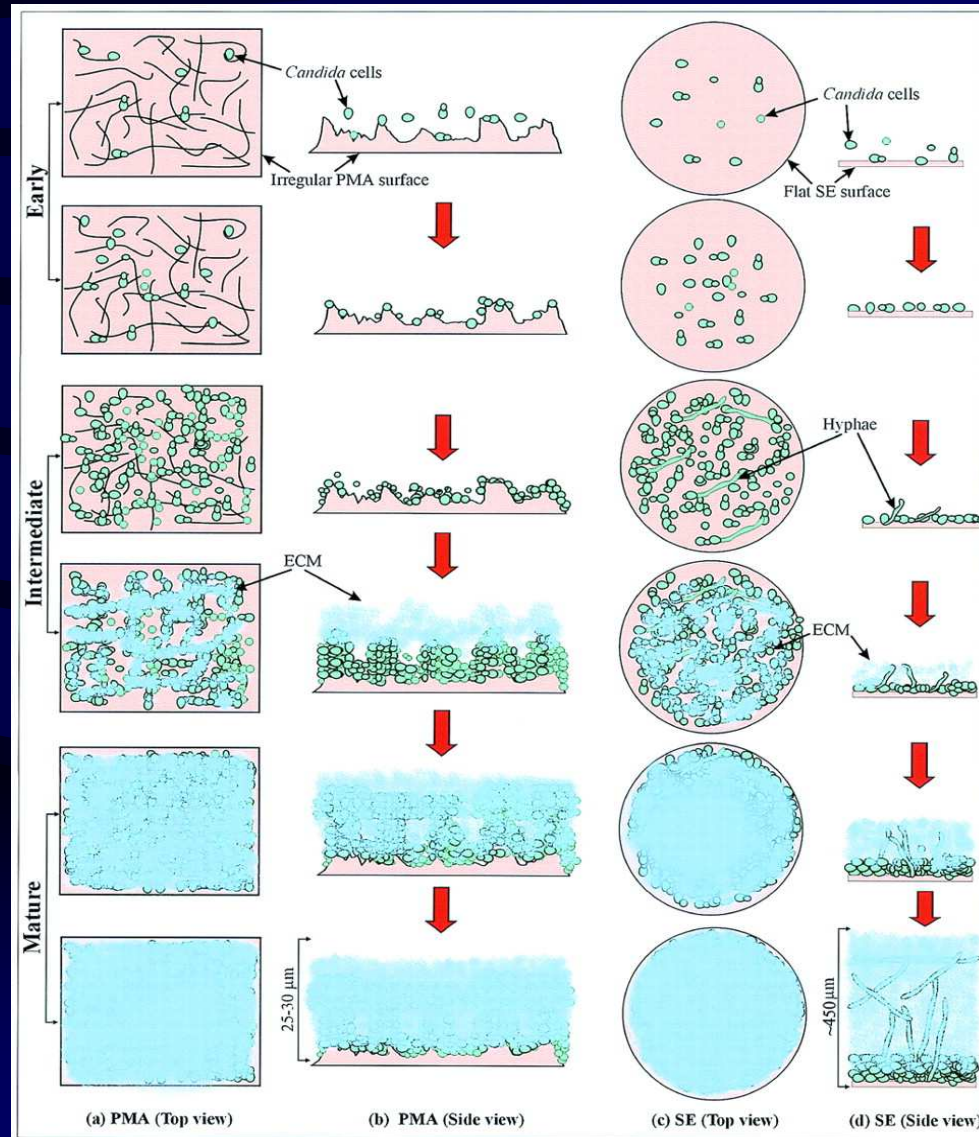
- *Enterococcus faecalis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*

25%

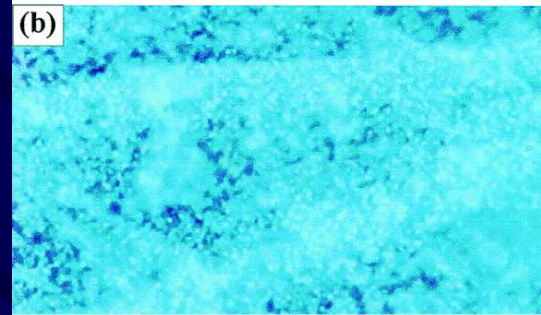
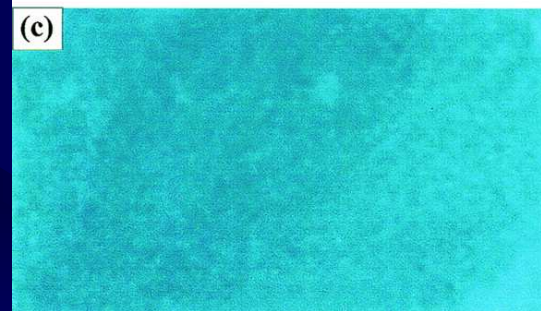
- *Candida albicans*
- *Candida parapsilosis*

15%

**Studi multicentrici di pazienti con candidemia associata all'impianto di cateteri rilevano una mortalità >40%**

## Rappresentazione schematica della formazione di biofilm di *C. albicans*

# Sviluppo di biofilm di *C. albicans* su strisce di polimetilmetacrilato

(a) Fase iniziale

(b) Fase intermedia

(c) Fase di maturazione

Immagini al microscopio a fluorescenza, utilizzando "calcofluor-white"
Chandra J. et al. J. Bacteriol. 2001,183,5385

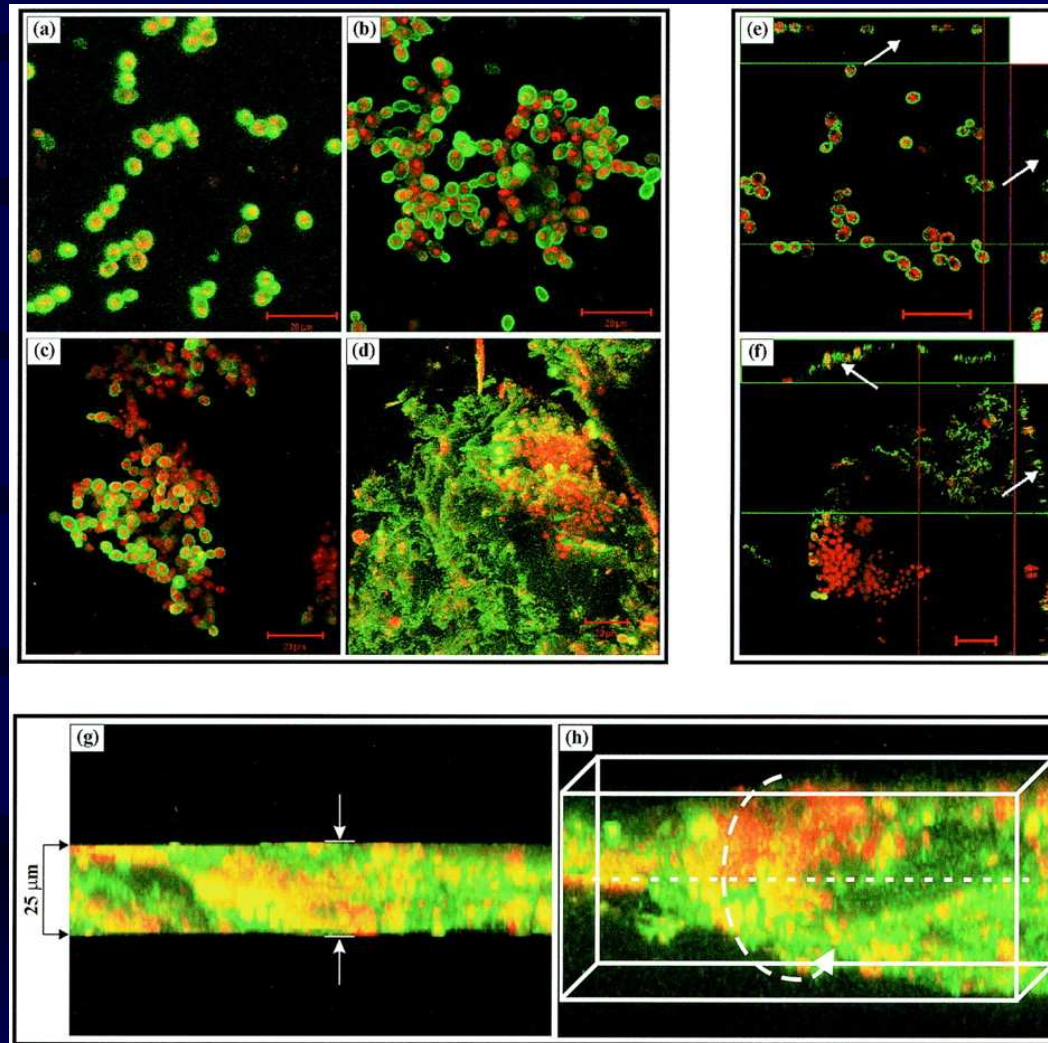
# Sviluppo di biofilm su una superficie di protesi dentaria

a-d: fase iniziale

(a): 0 h

(b): 8 h

(c): 11 h

(d): 48 h

(e):fase iniziale

(f): fase di maturazione

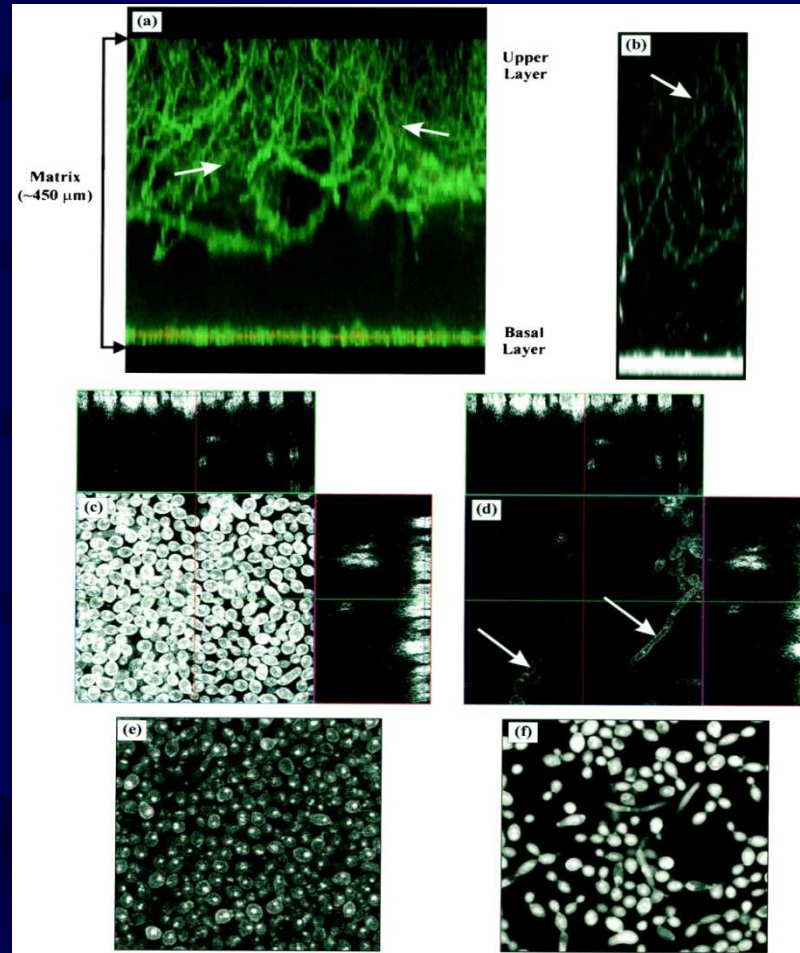
g-h: sezione verticale tridimensionale del biofilm

**Immagini al microscopio confocale; biofilm colorati con una sostanza fluorescente FUN-1 e con concanavalina-A**

Chandra J. et al. J. Bacteriol. 2001,183,5385

# Sviluppo di biofilm su una superficie di elastomero di silicone

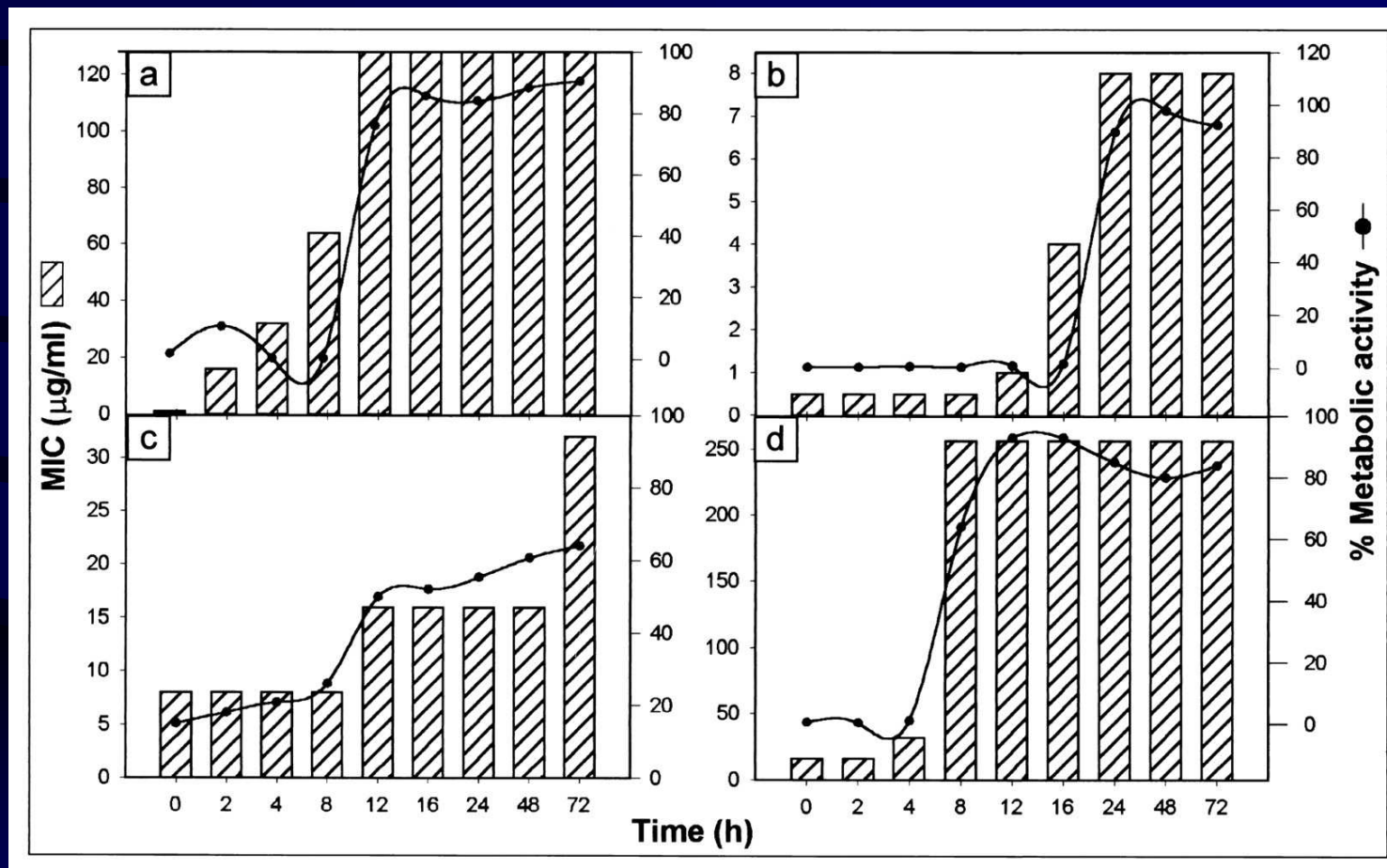
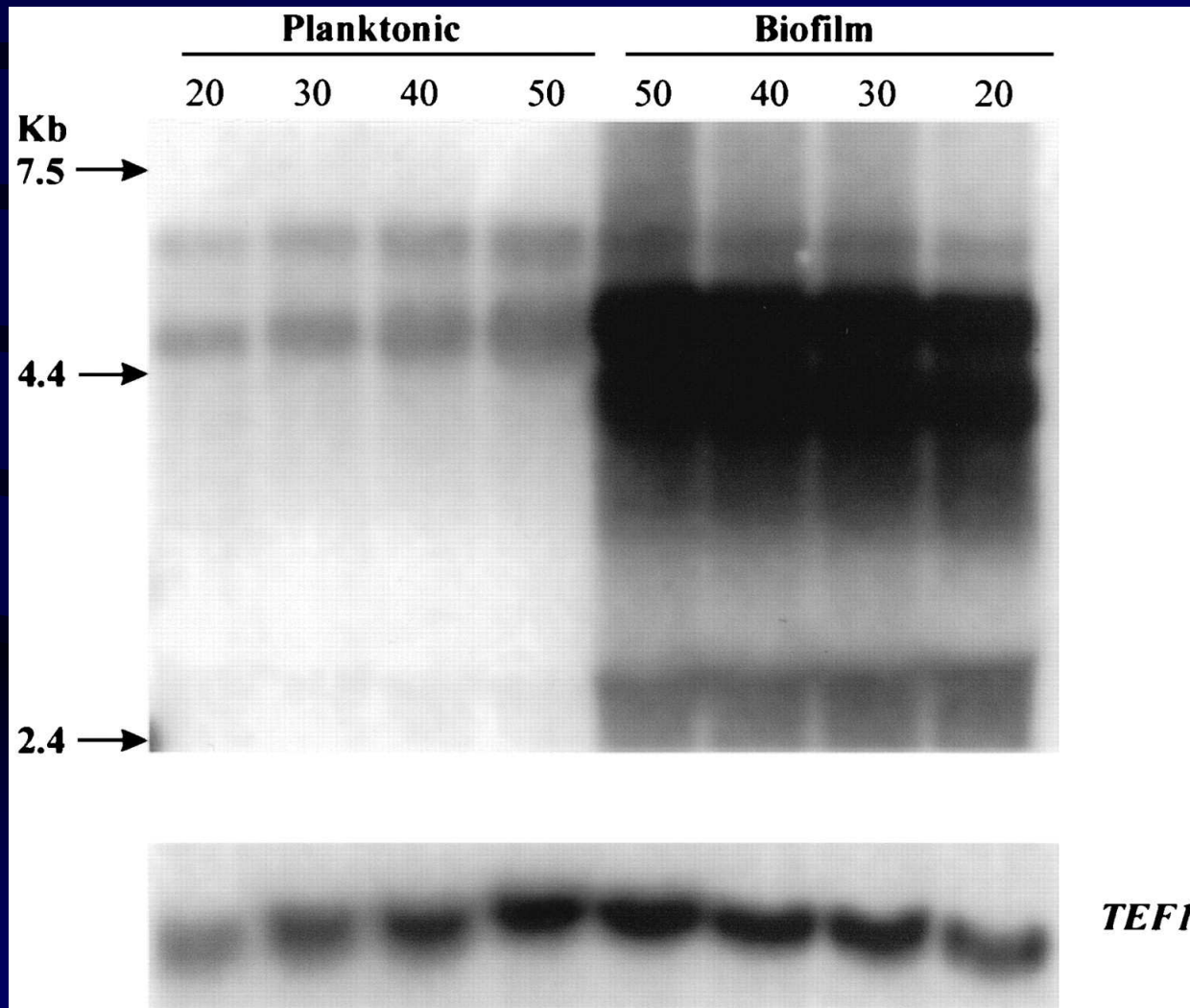
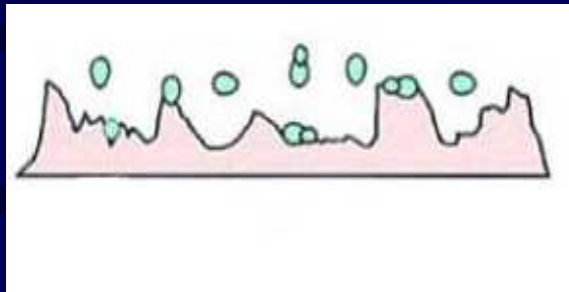
**(a) e (b)**
**Biofilm maturo**

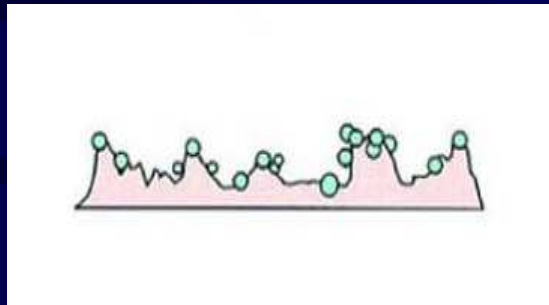
**(c) - (f)**
**Strato basale**

**Immagini al microscopio confocale a scansione laser, utilizzando "calcofluor-white"**

**Chandra J. et al. J. Bacteriol. 2001,183,5385**

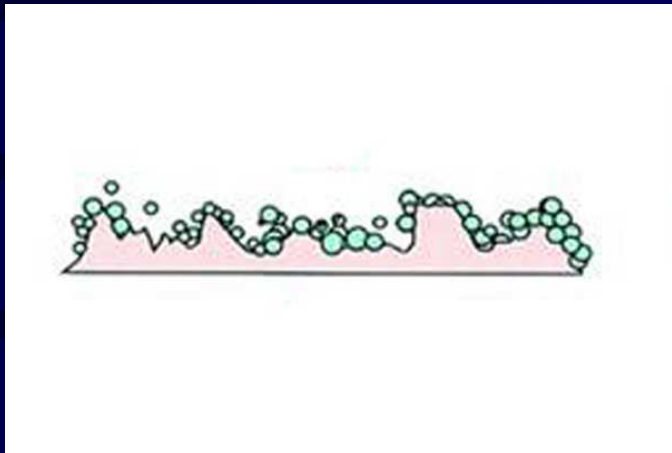
# Correlazione tra sviluppo di biofilm, attività metabolica e resistenza agli antifungini

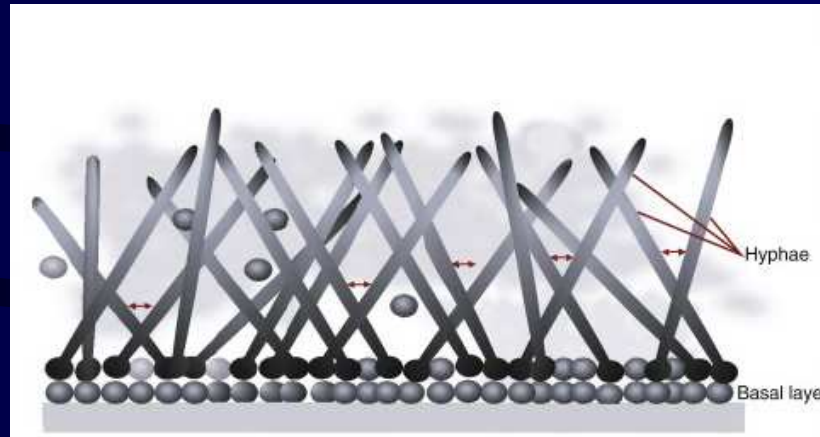
**a: fluconazolo**
**b: amfotericina**

**c: nistatina**
**d: cloroexidina**

# Analisi mediante northern blot di RNA totale estratto di cellule in fase planctonica e da biofilm

## Controllo genetico della formazione di biofilm fase iniziale: contatto con la superficie

Dopo 6 ore:
Aumento di espressione di geni che controllano le pompe di efflusso CDR e MDR
Mutanti: biofilm immaturi; aumento della suscettibilità agli azoli (Mukherjee P.K. *et al*., *Infect. Imm.* 2003, 71, 4333)

# Comunicazione cellula-cellula

- 2 molecole: farnesolo e tirosolo (Cao Y.Y. *et al. Ag Antimicrob Chemoth* 2005, 49, 584)
- Aumento di espressione dei geni del sistema MAP chinasi: CHK1 Mutanti: ridotta formazione di ife e di biofilm

  (Kruppa M. *et al. Eukaryot cell*, 2004, 3, 1062)

# Fase intermedia
# Aderenza

- YWP (yeast wall protein) Mutanti: aumentata aderenza
- Aumento di espressione dei geni ALS (aggltunin like sequence protein) Mutanti: difetti nella formazione di biofilm
- HWP (hyphal wall protein) Mutanti: difetti nella formazione di biofilm
- EAP1 (enhanced adherence to polystyrene)aumentata espressione permette l'aderenza del mutante efg/cph a vari substrati
- BCR 1 (biofilm and cell wall regulator)  Mutanti: difetti nella formazione di biofilm (Nobile CJ and Mitchell A.P., *Cell Microbiol,* 2006, 8, 1382. Nobile C.J. et al. Current Biology 2008, 18, 1017)

## **Fase intermedia**
## Sviluppo di ife

Aumento di espressione dei geni:

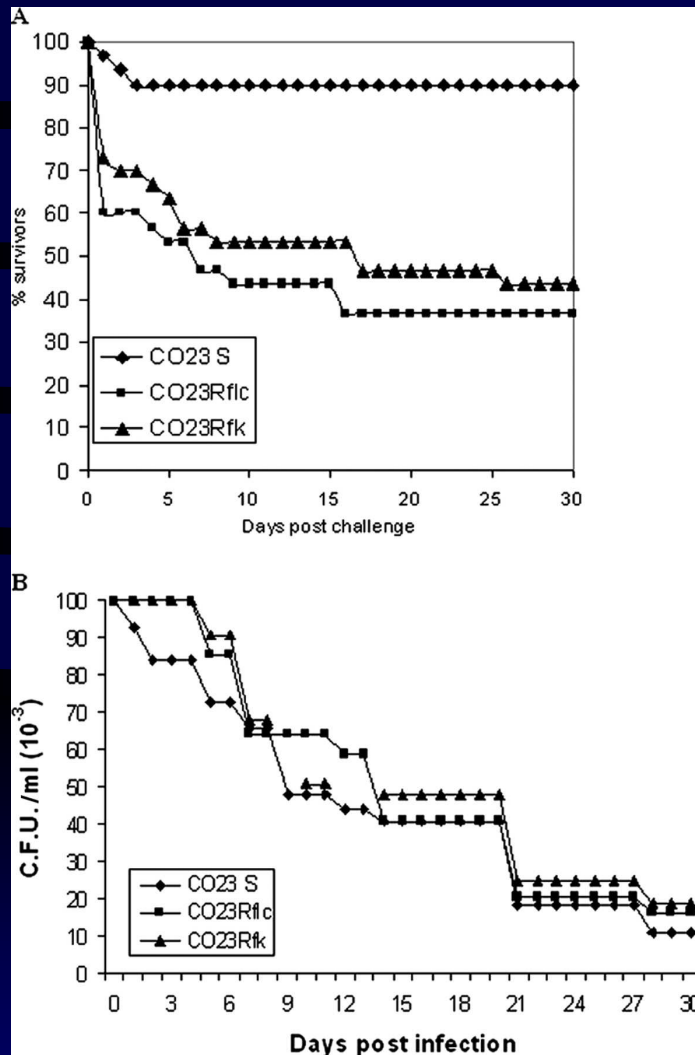
- CPH1 proteine con attività fosftasica
- EFG1 proteine con attività di adenilciclasi e di chinasi
- Mutante con i geni CPH1 e EFG1 deleti non forma ife e non forma biofilm
- (Lewis R. E. et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46,1153)

# Increase of Virulence and its Phenotypic Traits in Drug-Resistant Strains of *Candida albicans*

Letizia Angiolella [(1)], Anna Rita Stringaro [(2)], Flavia De Bernardis [(3)], Brunella Posteraro [(4)], Mariantonietta Bonito [(1)], Laura Toccacieli [(2)], Antonella Torosantucci [(3)], Marisa Colone [(2)], Maurizio Sanguinetti [(4)], Antonio Cassone [(3)], and Anna Teresa Palamara [(1)]

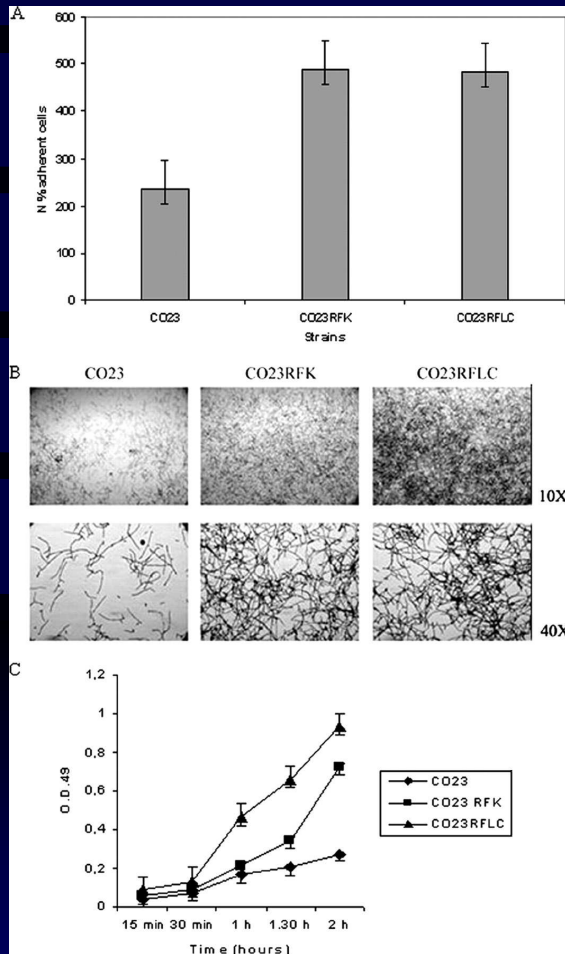
*Department of Public Health Sciences G. Sanarelli, University of Rome "La Sapienza," Italy,1*
*Department of Technology and Health,2*
*Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy,3*
*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy, 4*

**ANTIMICROBIAL,AGENTS AND CHEMOTHERAPY 2008,52,927**

**Patogenicità degli isolati di C. albicans nel modello di infezione sistemica e mucosale**

A) Infezione sistemica in topi BALB/C (inoculo $10^7$ cellule) Si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra la sopravvivenza del ceppo sensibile e quella dei ceppi resistenti agli antimicotici.

B) Infezione intravaginale in ratte ovarectomizzate e trattate con estrogeni (inoculo $10^7$ cellule). Non c'è una differenza significativa tra le colonizzazioni vaginali degli isolati

**CO23** ceppo sensibile
**CO23R** flc ceppo resistente al fluconazolo
**CO23Rk** ceppo resistente alla micafungina

# Aderenze e formazione di biofilm degli isolati sensibili e resistenti agli antimicotici

A) Percentuale di cellule aderenti alla plastica

B) Produzione di biofilm su una superfice di polistirene-Biofilm colorati con cristalvioletto e fotografati a 10X e 40X microscopio invertito.

C) Saggio di formazione al biofilm con la metodica XTT-menadione

| | |
|---|---|
| **CO23** | ceppo sensibile |
| **CO23Rflc** | ceppo resistente al fluconazolo |
| **Co23K** | ceppo resistente alla micafungina |

Cellular Microbiology (2007) 9(5), 1223–1238

# The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative β-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity

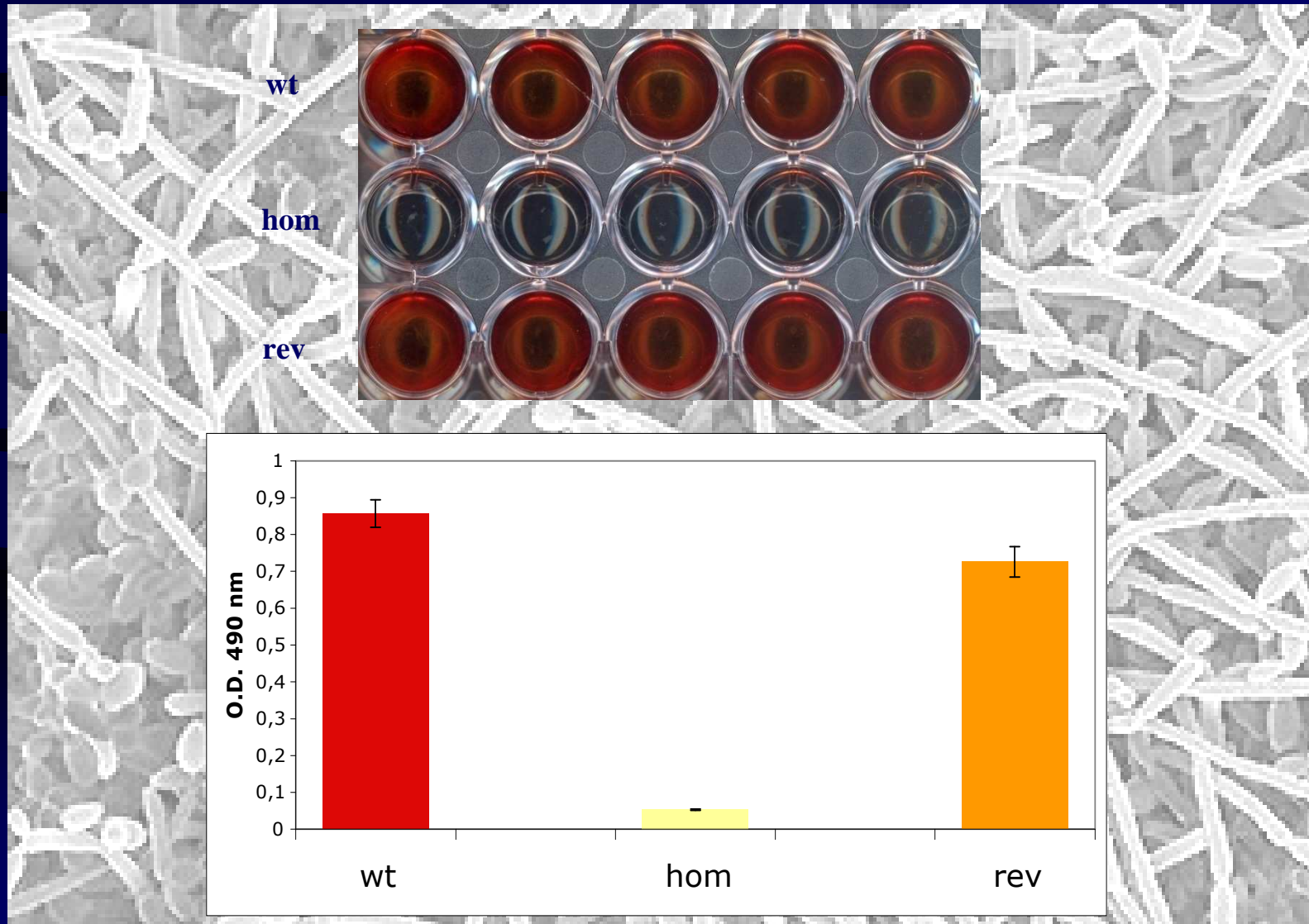
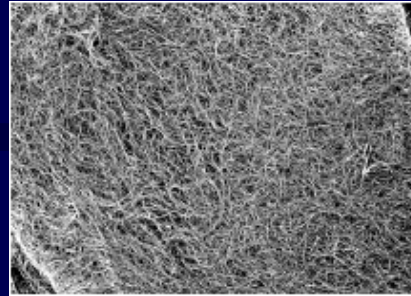
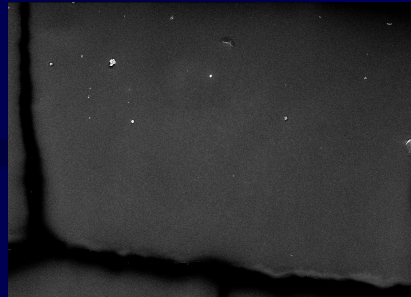
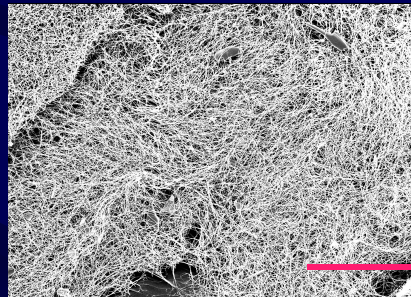
**Silvia Sandini,[1†] Roberto La Valle,[1†] Flavia De Bernardis,[1] Caterina Macrì[2] and Antonio Cassone[1*]**
[1]*Departments of Infectious, Parasitic and Immuno-mediated Diseases* [2]*Food Safety and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità*
*Rome, Italy.*

**Camp65p is a putative β-glucanase mannoprotein of 65 kDa which has been characterized as a main target of human immune response against *Candida albicans.* We constructed CAMP65 knock-out mutants including null camp65/camp65 and CAMP65/camp65 heterozygous strains. The null mutants lost adherence to the plastic. The null mutants were also significantly less virulent than the parental strains, and this loss of virulence was observed both in systemic and in mucosal *C. albicans infection models.***

# MUTANTE DI *C.ALBICANS* CaMP65

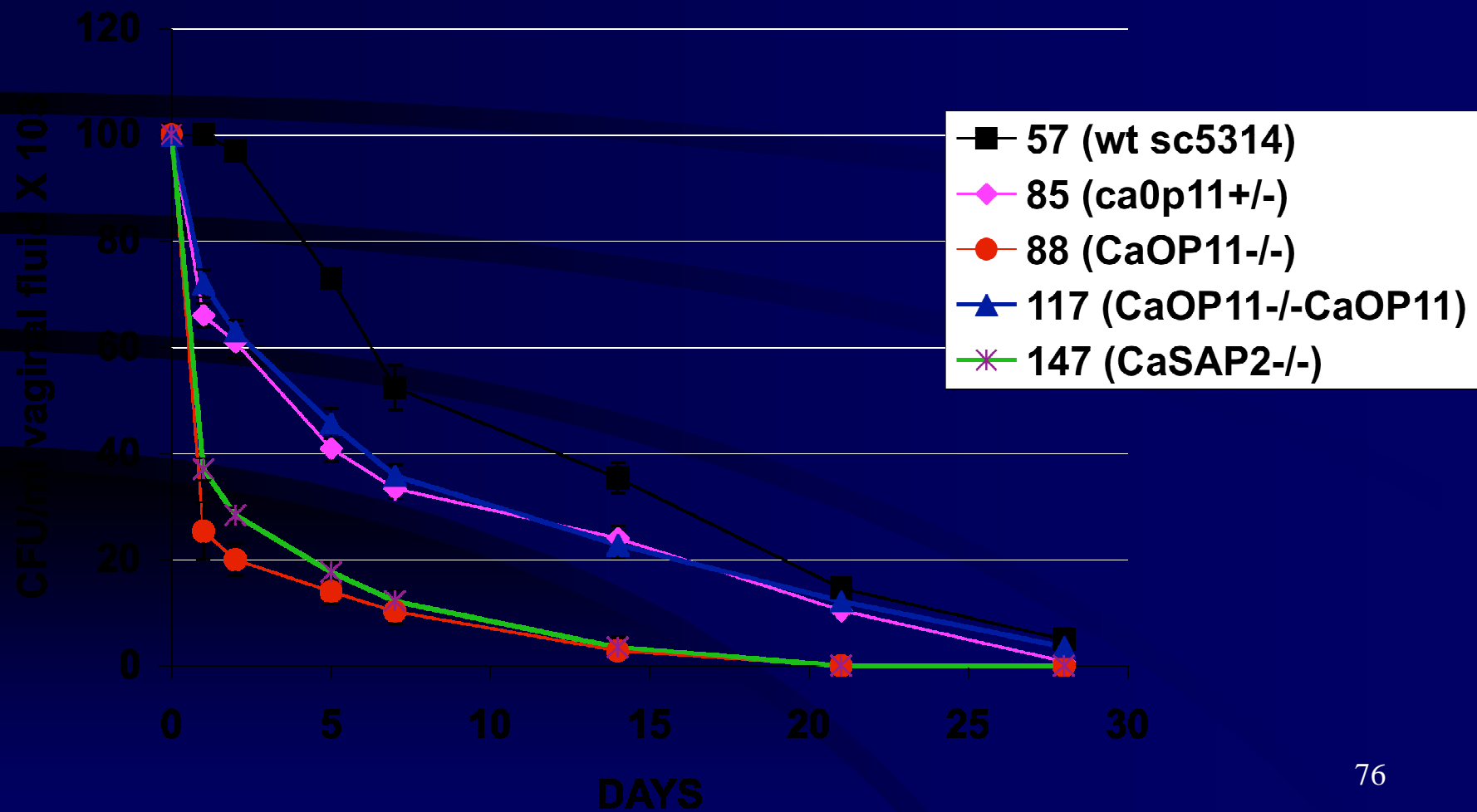
- Il mutante con il gene CaMP65 che codifica per una mannoproteina, deleto è risultato meno virulento del ceppo parentale nel modello di infezione sistemica nel topo e nel modello di vaginite nelle ratte.
- Abbiamo valutato la formazione di biofilm di questo mutante.

(Sandini S. et al. Cell. Microbiol. 2007,9, 1233)

# Analisi dei biofilm dei mutanti camp65Δ mediante saggio XTT-menadione

## Sviluppo di biofilm dei mutanti camp65Δ su piastre di polistirene

**Immagini al microscopio elettronico a scansione (barra= 500 μm)**

## MUTANTE DI *C.ALBICANS CaOPI1*

**Gene CaOPI1 regola la trascrizione di SAP 2.**
**Nel mutante con il gene CaOPI1 deleto si ha ridotta espressione di SAP 2.**
**La distruzione del gene determina lieve diminuzione di virulenza nel modello di infezione sistemica nel topo.**
**Il mutante è significativamente meno patogeno nel modello di vaginite nella ratta.**
**Abbiamo valutato la formazione di biofilm di questo mutante.**

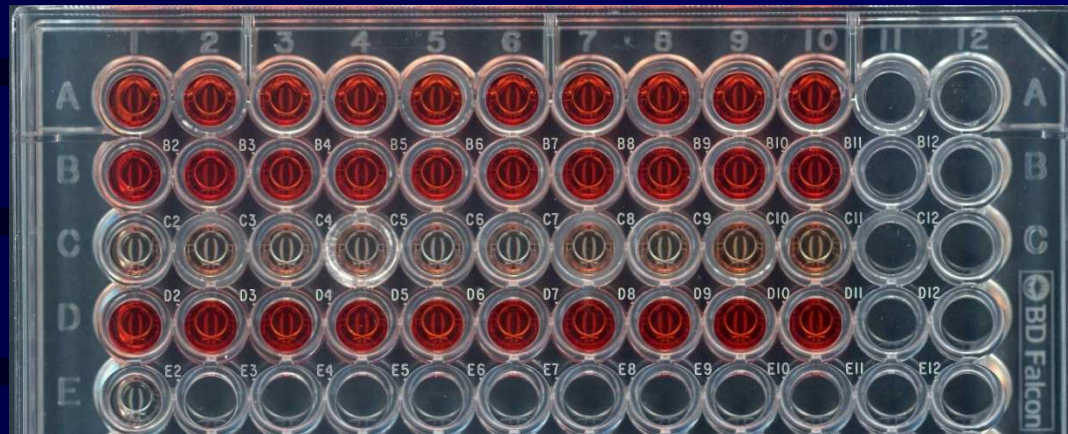
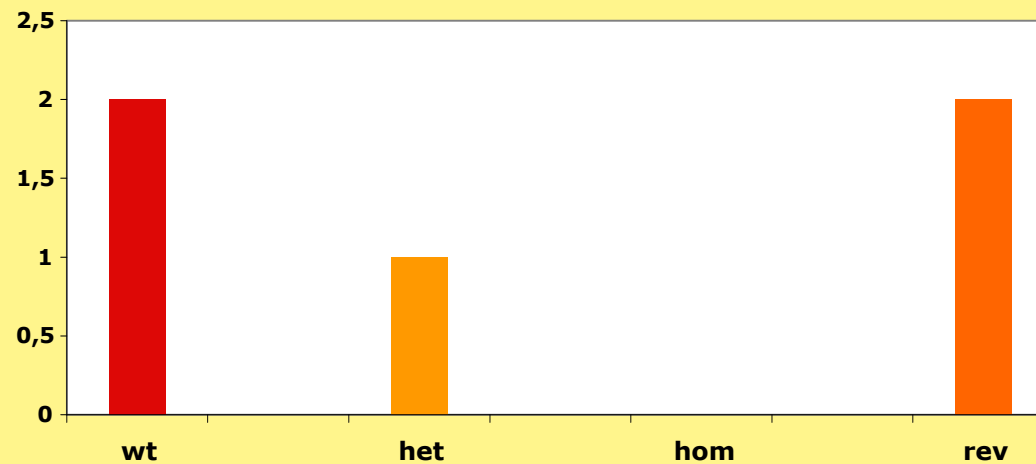
**Vaginal colonization in rats intravaginally inoculated wit*h C.albicans* mutants CaOPI1**

# Analisi dei biofilm dei mutanti CaOPI1 mediante saggio XTT-menadione

wt

het

hom

rev

ctr

# CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano che :

- La resistenza agli antimicotici di isolati clinici di *C.albicans* è correlata alla formazione di biofilm e all' aumento di virulenza.
- Durante la formazione di biofilm vi è un aumentata espressione di geni che codificano per adesine (ALS, HWP, EAP, BCR) e di geni che regolano la morfogenesi (EFG, CPH).
- Un mutante di *C.albicans* knock- out per il gene CaMP65, che codifica per una mannoproteina, risultato meno virulento del ceppo parentale in modelli animali, non forma biofilm.
- Un mutante di *C.albicans* con il gene CaOPI1, che regola la trascrizione di Sap2, deleto, risultato meno virulento nel modello di vaginite, non forma biofilm.

# CONCLUSIONI (cont.)

- E’ importante avere evidenziato che la formazione di biofilm sia associata all’espressione di fattori di virulenza che svolgono un ruolo importante nella patogenesi delle candidosi.
- E’ importante avere evidenziato geni che controllano la formazione di biofilm.